UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

ANNEE 1972 - 1973

SERIE E. N° 275

THÈSE

Présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES
DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

par

JEAN-FRANÇOIS LETAVERNIER

Contribution à l'étude analytique et à la détection de traces de propiolactone

Soutenue le 6 juin 1973
devant la Commission d'examen

JURY : MM. J-A. GAUTIER Professeur ..... Président

R. TRUHAUT Professeur
F. PELLERIN Professeur } ..... Examinateurs

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES DE PARIS

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

ANNEE 1972 - 1973

SERIE E. N° 275

THÈSE

Présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

DE L'UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES

DE PARIS

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'État)

par

JEAN-FRANÇOIS LETAVERNIER

Contribution à l'étude analytique et à la détection de traces de propiolactone

Soutenue le 6 juin 1973
devant la Commission d'examen

JURY : MM. J-A. GAUTIER Professeur ..... Président

R. TRUHAUT Professeur
F. PELLERIN Professeur } ..... **Examinateurs**

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Professeur J. A. GAUTIER,

Professeur de Chimie Organique à l'Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Paris V,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Pharmacien en Chef honoraire des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,

Officier de la Légion d'Honneur.

A Monsieur le Professeur R. TRUHAUT

Membre de l'Académie des Sciences,

Membre de l'Académie Nationale de Médecine,

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle à l'Université René Descartes,

Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,

Chef de l'Unité de Chimiothérapie de l'Institut Gustave Roussy,

Commandeur de la Légion d'Honneur.

A Monsieur le Professeur F. PELLERIN,

Professeur de Chimie Analytique à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Rouen,

Pharmacien-Chef de l'Hôpital Général d'Eaubonne.

Contribution à l'étude analytique et à la détection de traces de propiolactone

INTRODUCTION

La propiolactone est un agent d'alkylation utilisé dans de nombreuses réactions de synthèse organique et de polymérisation. Ses propriétés alkylantes ont été mises à profit comme agent de stérilisation (I5.52.68.69.I03.I09) et d'inactivation (5I.I05.I06) : l'alkylation entraîne selon PHILLIPS (87) la dénaturation des protéines bactériennes et virales et SCHONWALDER (97) a indiqué qu'elle montre dans ce domaine une activité supérieure à celle de l'oxyde d'éthylène.

Son emploi a été préconisé par LO GRIPPO (69.70.7I) pour la stérilisation des greffes et du plasma humain et elle est utilisée pour la dénaturation des virus poliomyélitique et rabique.

Les propriétés alkylantes de la propiolactone sont également responsables de son action irritante et cytotoxique (68.II4). Des propriétés carcinogénes lui ont été reconnues (9.I5.I6.I04) et ont donné lieu à de nombreux travaux (2.I2.20.2I.22.85.87.88.90.9I.92.94.95.99.II0.II6). Du fait de ses propriétés cytotoxiques, l'emploi de la propiolactone doit être particulièrement surveillé et implique ainsi la participation de la chimie analytique pour la détection de traces pouvant exister dans les préparations d'origine biologique et préciser, en fonction de sa stabilité en solution, les modalités de son emploi.

Dans le cadre général de l'analyse des additifs chimiques à usage pharmaceutique, biologique ou alimentaire, le Professeur PELLERIN nous a demandé d'étudier la propiolactone. Notre recherche a eu pour objet de proposer des méthodes d'identification et de dosage de traces de propiolactone dans des milieux variés. Cette étude a abouti à la mise au point de méthodes polarographiques et colorimétriques. De plus, la mise au point de ces méthodes exigeait une étude préalable des propriétés physicochimiques de la propiolactone susceptibles d'être retenues pour l'analyse.

Nous remercions Monsieur le Professeur J-A GAUTIER de tout l'intérêt qu'il nous a témoigné ainsi que d'avoir bien voulu accepter la présidence de cette thèse.

Monsieur le Professeur R. TRUHAUT, dont les travaux en matière d'additifs alimentaires et pharmaceutiques font autorité, nous a fait le grand honneur de bien vouloir juger notre travail. Nous tenons à lui exprimer nos remerciements et espérons que ce modeste travail de Chimie Analytique apportera quelques éléments nouveaux pour des études toxicologiques et biochimiques approfondies.

Monsieur le Professeur F. PELLERIN a dirigé notre travail et nous a fait bénéficier de son expérience et de ses conseils ; qu'il nous permette de lui exprimer notre très vive et très respectueuse reconnaissance.

PREMIERE PARTIE

PROPIOLACTONE

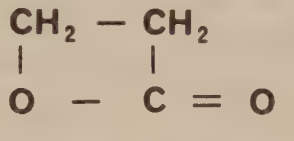
RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DE LA PROPIOLACTONE

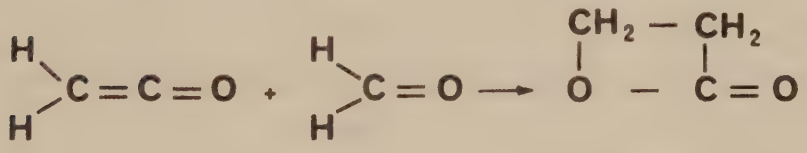
I. Généralités :

La propiolactone ou lactone de l'acide β-hydracrylique▲ (▲acide hydroxy-3 propionique)



$(C_3H_4O_2 = 72,06)$

a été synthétisée en I9I5 par JOHANNSON (55.56) ; la synthèse industrielle de KUNG (65) met en oeuvre la condensation du cétène avec le formaldéhyde à basse température en présence de catalyseurs :



2. Propriétés physiques :

La propiolactone est un liquide miscible à l'eau (37 % v/v) et à la plupart des solvants organiques.
Ses caractéristiques physiques sont les suivantes (II) (77) :

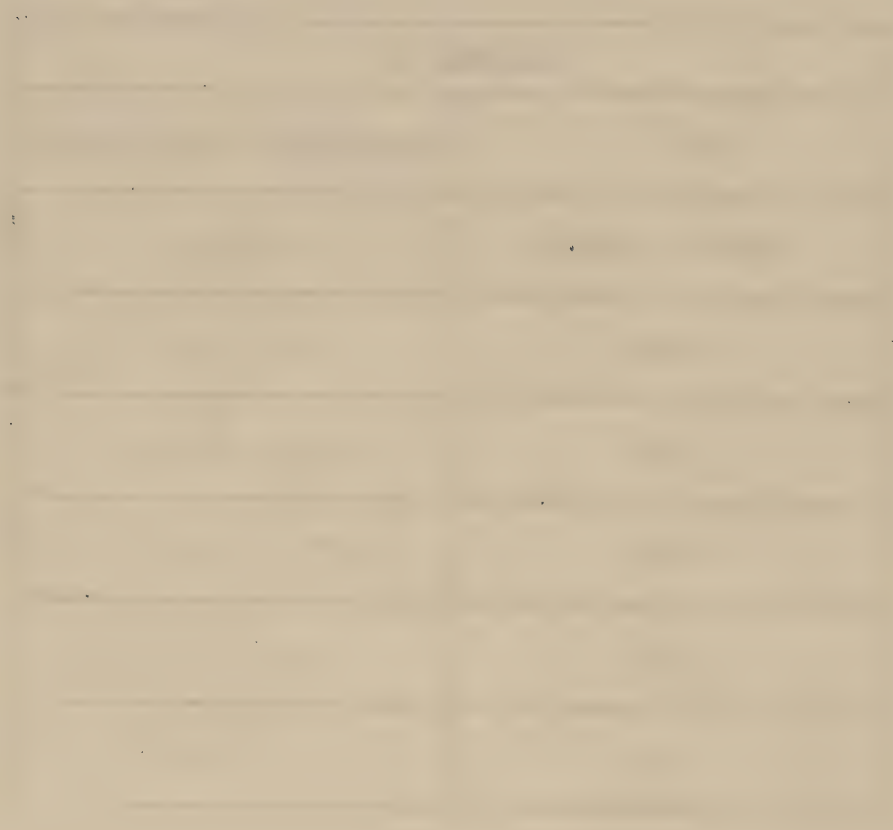
- densité 20º : I,I49
- point de fusion : - 33,4º
- point d'ébullition (760 mm) avec décomposition : + I62º
- point éclair : + 70º
- indice de réfraction : I,4I3I

En outre, il convient de mentionner que cette molécule n'a pas de spectre d'absorption dans l'ultraviolet, mais en revanche présente des bandes d'absorption caractéristiques dans l'infra-rouge, rassemblées dans le tableau suivant :

TABLEAU I	
cm^{-1}	groupement fonctionnel
3 000 - 2 930	$- CH_2 -$
I 840	$- C = O$
I 750	$- CH_2 - CO - R$
I 420	$- CH_2 - C = O$
I 205	$- C - O -$
I IIO	$- C - O -$

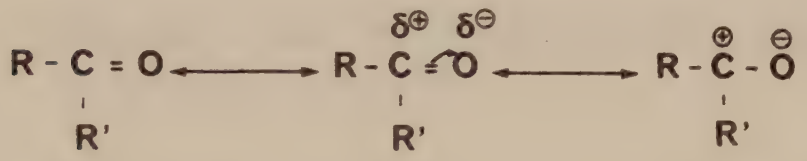
3. Propriétés chimiques :

A partir de I947, ces propriétés ont fait l'objet d'études systématiques qui ont permis d'obtenir (références 27 à 50) une propiolactone purifiée à partir du produit



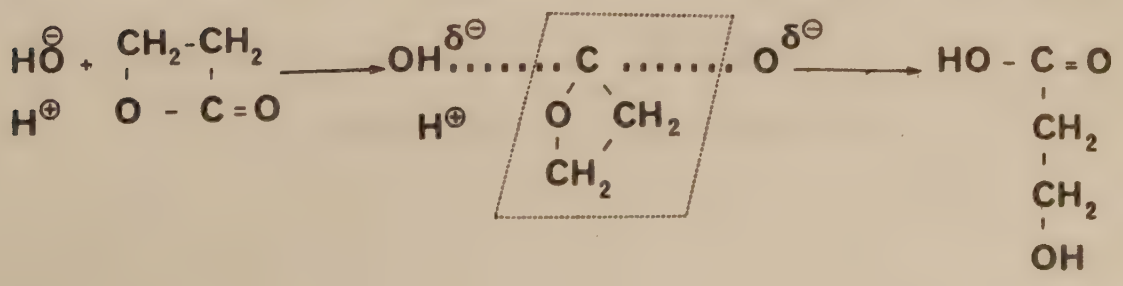
préparé industriellement par le procédé de KUNG (49).

Les réactions chimiques de la propiolactone sont dues à la présence du carbonyle qui est à l'origine d'un effet mésomère :



Cette polarisation du carbonyle permet l'entrée en jeu de la molécule dans des réactions de substitution nucléophiles ; ces réactions sont classiques et donnent lieu à des réactions de déplacement bi-moléculaire avec clivage de la liaison alkyl-oxygène (95).

L'atome pauvre en électrons sera attaqué par les réactifs nucléophiles. Quand le réactif nucléophile sera le solvant, il y aura solvolyse selon le schéma suivant : l'ion OH^- tendra à s'approcher du C $\delta^\oplus$ tout en restant aussi éloigné que possible de l'O $\delta^\ominus$, son approche va repousser les électrons vers l'O $\delta^\ominus$. Cela nécessitera le passage par un état de transition bi-moléculaire de type SN_2.



Le mécanisme a été confirmé par KOBAYASHI (59) et ZAUGG (II7) qui ont étudié le clivage possible de la liaison =

. soit acyl-oxygène,
. soit alkyl-oxygène

et ont pu établir que la réaction était d'ordre 2.

Remarque : Dans une réaction de solvolyse, la réaction est d'ordre I apparent.

Par ailleurs, BARTLETT (4.5) a établi les constantes de vitesse des réactions de substitution SN_2 du thiosulfate de sodium, de l'eau et de l'acétate de sodium avec la propiolactone.

Les propriétés chimiques de la propiolactone peuvent se diviser en trois groupes :

- réactions de polymérisation
- réactions d'alkylation
- réactions diverses.

a) Réactions de polymérisation :

La propiolactone pure se polymérise en quelques heures à I50º, selon la réaction suivante (27) :

$$(n)\ \begin{matrix} CH_2 - CH_2 \\ | \qquad\quad | \\ O - C = O \end{matrix} \longrightarrow R-COO(CH_2-CH_2COO)_{(n-2)}-CH_2-CH_2COOH$$

R étant un reste-vinyl $\longrightarrow$ $CH_2 = CH-$

ou hydroxyéthyl $\longrightarrow$ $HO-CH_2-CH_2-$

La réaction de polymérisation est catalysée par les acides, les bases et les sels métalliques. Dans ce cas, la réaction est brutale et exothermique.

Selon leur degré de polymérisation, les produits peuvent se présenter sous forme d'huile visqueuse incolore ou de solide blanc ; le poids moléculaire varie de 800 à I 000 et tous les polymères comportent une fonction acide titrable.

Par saponification, on obtient les sels de l'acide poly hydroxy-3 propionique (polyhydracrylique) :

$$HO - CH_2 - CH_2 - COO - (CH_2 - CH_2COO)_n - CH_2 - CH_2COOH$$

$$\xrightarrow{NaOH} (n + 2)\, HO - CH_2 - CH_2 - COO\,Na$$

Par alcoolyse, en présence d'acides, on obtient les esters de l'acide hydroxy-3 propionique (3I) :

$$\text{polymère} \xrightarrow[\text{alcool}]{R'OH} HO - CH_2 - CH_2 - COO\,R$$

Par chauffage à I50º, les polymères libèrent l'acide acrylique $CH_2 = CH - COOH$.

Il est également possible d'obtenir, par action de sels d'acides carboxyliques des acides polyhydracryliques et par action des alcools en présence de catalyseurs, des esters d'acides polyhydracryliques.

b) Réactions d'alkylation :

La propiolactone est un agent d'alkylation puissant, réagissant à ce titre avec de nombreuses molécules organiques. Ces réactions se déroulent en général avec d'excellents rendements, toutefois les produits formés coexistent souvent avec :

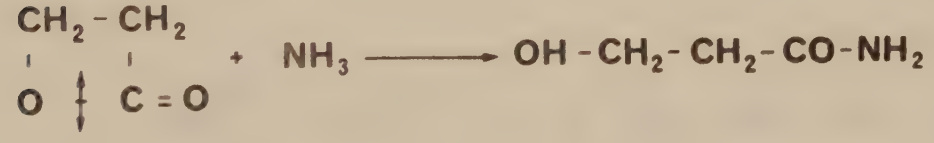
. soit des produits de dégradation de la propiolactone,
. soit des produits de réactions secondaires.

En conséquence, nous nous limiterons à citer les réactions chimiques susceptibles d'être transposées sur le plan analytique et quelques réactions illustrant la réactivité de la molécule.

La propiolactone agit selon deux modalités différentes :

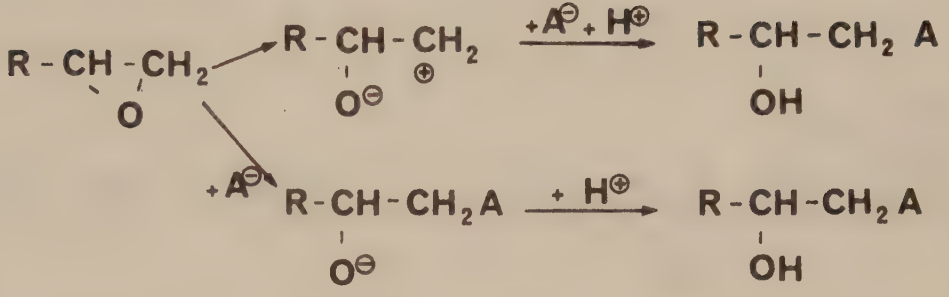
. soit avec ouverture du cycle au niveau de la liaison alkyl-oxygène :

. soit au niveau de la liaison acyl-oxygène :

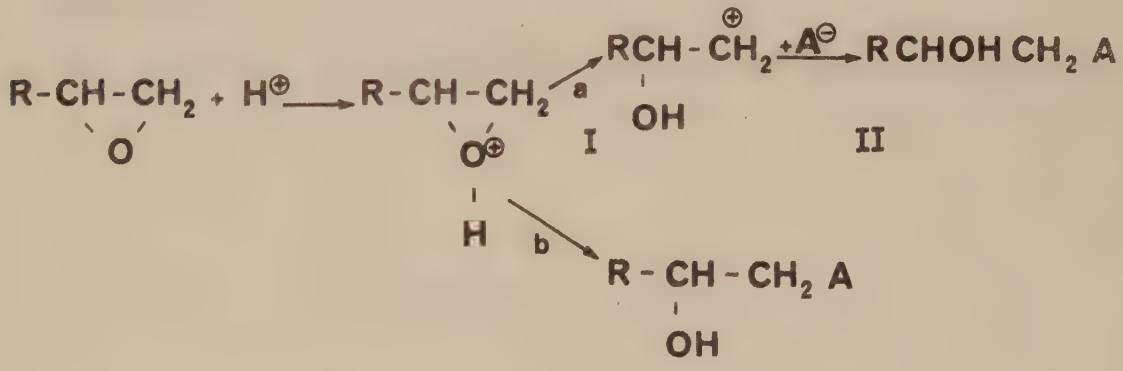


Ces réactions ont lieu le plus souvent en milieu aqueux et présentent de grandes similitudes avec celles des epoxydes avec les nucléophiles (A^-) (94.95).

On observe en milieu neutre :

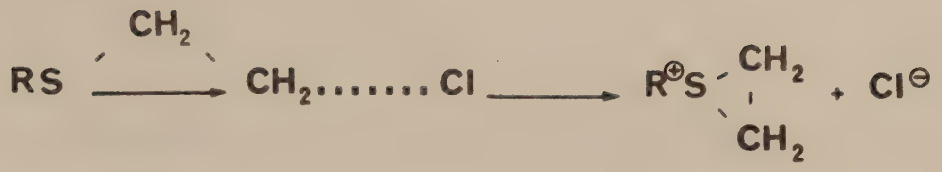


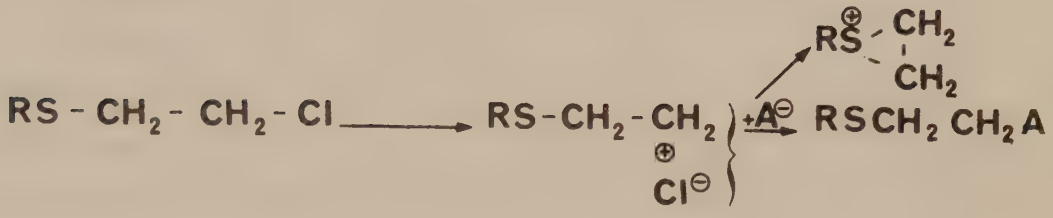
En milieu acide, il y a formation d'un acide conjugué qui réagit avec un anion selon un mécanisme unimoléculaire (a) ou bimoléculaire (b) :



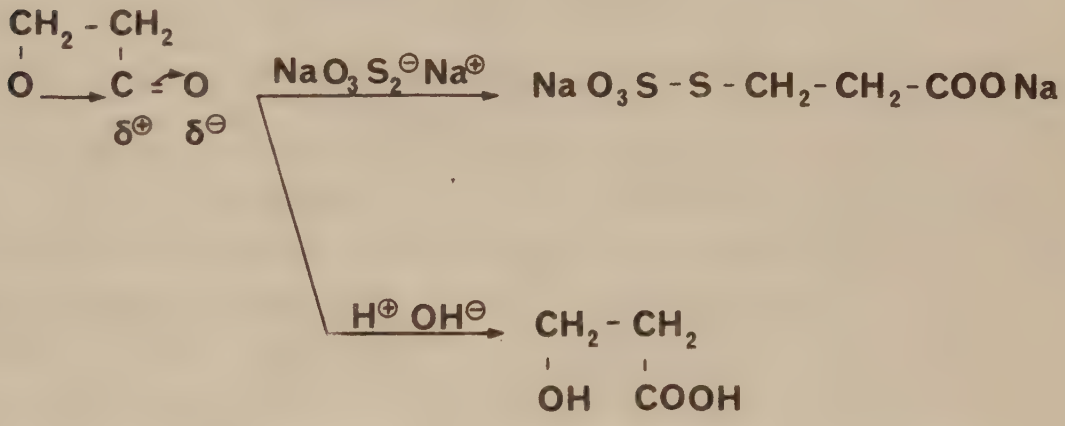
Ces propriétés sont également à rapprocher de celles des éthylène-imines (I) (25) :

et de celles des sulfures de 2-chloréthyle.





Dans le cas de la propiolactone, le mécanisme le plus vraisemblable est une substitution nucléophile de type SN_2 (I4)



Les analogies de structure et d'activité de ces divers composés permettent de supposer que les méthodes analytiques proposées pour la propiolactone permettent également d'identifier et de doser bien d'autres composés alkylants.

SWAIN et SCOTT (I08) ont proposé une classification des alkylants selon leur activité :

$$\log \frac{ka}{ko} = sn$$

ka : constante de réaction avec le nucléophile

ko : constante de réaction avec l'eau

s : constante du substituant (qui dépend du nucléophile)

n : constante du nucléophile

La propiolactone se situe entre les méthanesulfonates et les moutardes azotées avec une constante s = 0,77. Le bromure de méthyle ayant une constante s = I par définition.

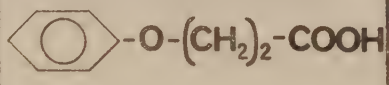
Les réactions les plus significatives sont rassemblées dans le tableau suivant :

OUVERTURE ALKYL-OXYGENE

TABLEAU II			
réactif	formule	produit	référence
Dithiocarbamate d'ammonium	$H_2N-C(=S)-S-(CH_2)_2-COONH_4$	Dithiocarbamyl propionate d'ammonium	(29) (32)
Thio-urée	$(H_2N)(HN=)C-S-(CH_2)_2-COOH$	acide β-isothiouréidopropionique	(29) (47)
Acétate de sodium	$CH_3COO(CH_2)_2-COONa$	β-acétoxypropionate de sodium	(30) (34)
Acétylacétone	$CH_3-CO-CH((CH_2)_2COOH)-COCH_3$	acide 4-acétyl 5-oxohexanoïque	(44)

REACTIONS PARTICULIERES

TABLEAU III

réactif	conditions opératoires - remarques	produit	formule	référence
alcools R - OH	en présence d'une base	ester de l'acide hydroxypropionique	$OH-(CH_2)_2-COO-R$	(3I) (63)
	en milieu acide ou neutre	acide β-alkoxy propionique	$R-O-(CH_2)_2-COOH$	(3I) (64)
phénols 	sans catalyseur	acide β-phénoxy propionique		(4I)
	en présence d'un acide	hydracrylate de phényle	$OH-(CH_2)_2-COO-$	(4I)
amines I et II $R-NH$ R'	selon le solvant et l'ordre d'addition des réactifs	amino acide ⟶ ou amide ⟶	$R_{R'}N-(CH_2)_2-COOH$ $OH-(CH_2)_2-CO-N<^{R}_{R'}$	(45) (54) (93.98)

c) Réactions diverses :

Ces réactions sont mentionnées uniquement par le fait que leur rendement peut permettre une application

analytique, elles sont résumées dans le tableau suivant :

TABLEAU IV

réactif	produit	formule	référence
Thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3$	β-mercapto propionate de sodium	$Na\text{-}O_3S\text{-}S(CH_2)_2COONa$	(48)
Nitrite de sodium $NaNO_2$	β-nitropropionate de sodium	$O_2N\text{-}(CH_2)_2\text{-}COONa$	(48)

CHAPITRE II

ACTION BIOLOGIQUE DE LA PROPIOLACTONE

CHAPITRE II

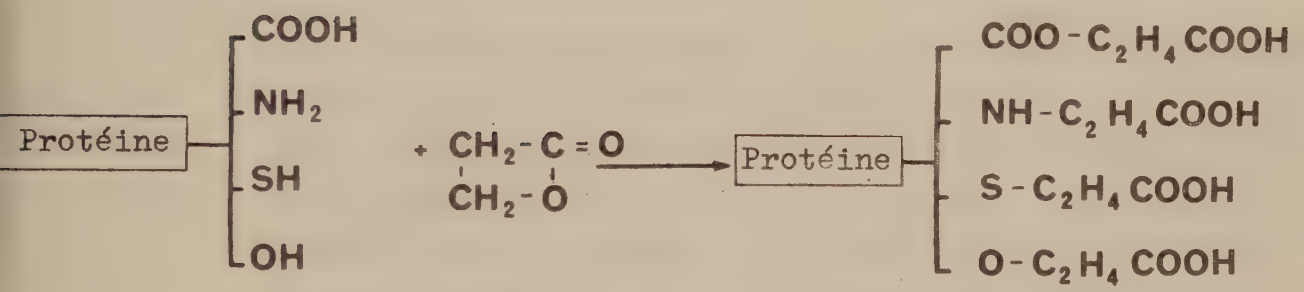
ACTION BIOLOGIQUE DE LA PROPIOLACTONE

Outre ses applications en synthèse organique pour ses propriétés alkylantes et pour la synthèse de polymères (79.82) (93), la propiolactone a été utilisée comme agent de stérilisation. HOFFMAN et WARSHOWSKI en ont préconisé l'emploi en 1958 (52) ; l'efficacité serait très supérieure à celle de l'oxyde d'éthylène sans en présenter les difficultés d'emploi. Son utilisation en solution a été préconisée par LO GRIPPO (69.70.71) et HARTMAN (51) dans le but de stériliser en particulier les greffons, les vaccins et divers produits biologiques.

Son action comme agent antiviral dans les préparations à base de sang humain a été décrite (51) ; il semble toutefois que son emploi ne soit pas entré dans la pratique courante à l'étranger. La législation française interdit toute addition d'antiseptiques et d'adjuvants aux préparations à base de sang humain. Néanmoins, des recherches sont en cours (2) car le risque de l'hépatite post-transfusionnelle demeure.

Outre ses propriétés stérilisantes, la propiolactone permet l'inactivation d'un certain nombre de préparations à base de virus. L'emploi de la propiolactone est courant dans la préparation du vaccin anti-poliomyélitique et s'étend maintenant aux vaccins antirabiques (19.21). Il repose sur les théories de PHILLIPS (87), FRAENKEL-CONRAT (22) et BOUTWELL (9).

De même que l'oxyde d'éthylène, la propiolactone permet d'alkyler les fonctions amine, alcool, thiol, acide carboxylique des protéines, selon le mécanisme suivant proposé par PHILLIPS :



Non seulement les protéines mais également les acides nucléiques sont susceptibles d'être alkylés ; certains de leurs composants en particulier : l'adénine et la guanine, ce qui rend fragile la liaison osidique de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Par rupture on obtient une "dépurination" qui rend l'ADN non fonctionnel pour la synthèse des protéines virales ou bactériennes. Ce mécanisme confirmé par de nombreux travaux (I5.90.9I.III) est à rapprocher de la technique de production des anatoxines qui utilisait l'aldéhyde formique, chimiquement voisin de la propiolactone.

Dans la préparation du vaccin antirabique, l'emploi de la propiolactone tend à supplanter celui du phénol comme l'ont démontré des travaux entrepris sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé (84).

A titre indicatif, lors de la préparation de ce vaccin, la propiolactone est ajoutée à raison de I ml pour 4 litres d'une suspension à IO % de matière cérébrale (homogénéisat de cervelles de chevreau). Le vaccin est ensuite placé pendant plusieurs heures à 37º afin de parfaire l'hydrolyse de l'excès de propiolactone utilisée pour l'inactivation.

Ces activités stérilisante et inactivante ont suscité de nombreux travaux et fait suspecter une activité carcinogène par l'action possible sur les acides nucléiques. Cette hypothèse a été vérifiée notamment par DICKENS (I6), BOUTWELL (9) et TAUBMAN (IIO) sur le rat et la souris. Il est probable que cette activité est à l'origine des restrictions apportées à l'emploi de la propiolactone. Aussi un travail de recherche analytique permettant de proposer une méthode suffisamment sensible pour détecter les traces de propiolactone non hydrolysée et suivre leur dégradation dans divers substrats nous est apparu indispensable.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DE LA PROPIOLACTONE

CHAPITRE III

ETUDE ANALYTIQUE DE LA PROPIOLACTONE

I. VERIFICATION DES CRITERES DE PURETE DE LA PROPIOLACTONE :

Nous avons utilisé des échantillons de propiolactone de diverses origines ; ces échantillons ont fait l'objet d'une étude expérimentale en vue d'en vérifier les critères d'identité et de pureté ainsi que la teneur en propiolactone.
L'identification est aisément assurée par spectroscopie dans l'infra-rouge et détermination de l'indice de réfraction.

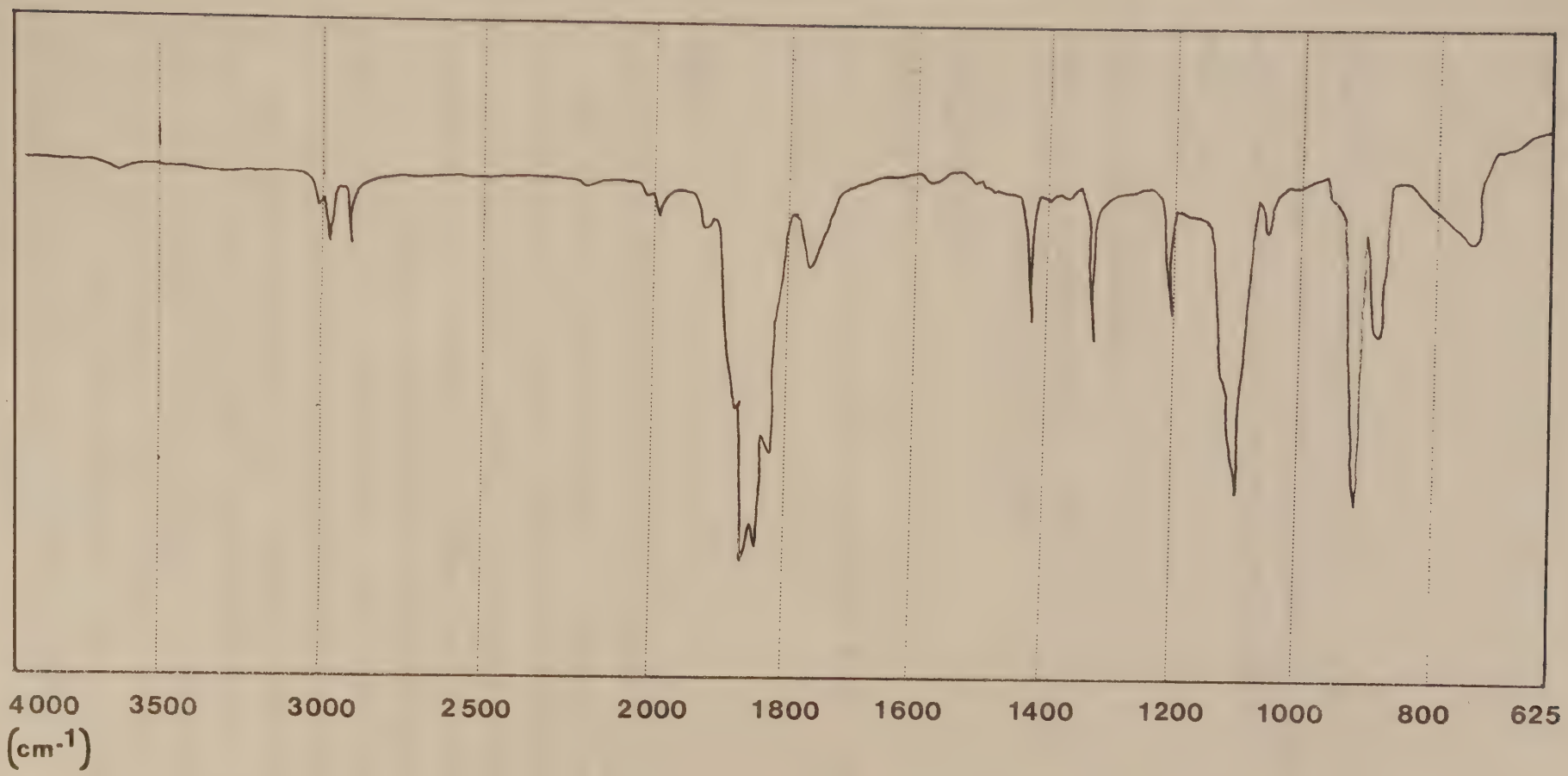
I. Spectroscopie infra-rouge :

- matériel : . spectrophotomètre Perkin-Elmer double faisceau, type 257 avec atténuateur.
  . cuve pour spectrophotométrie I. R.
  . tétrachlorure de carbone pour spectrophotométrie.

- mode opératoire :

Diluer les échantillons dans le tétrachlorure de carbone, de façon à obtenir une dilution finale à 2 % (p/v). Placer la dilution finale, dans la cuve de spectrophotométrie ; examiner parallèlement à un échantillon de tétrachlorure de carbone entre 4 000 et 625 cm^{-I}

FIGURE 1



PROPIOLACTONE

-spectre infra-rouge-

Interprétation : Le spectre (figure I page 22) doit présenter les bandes caractéristiques des groupements méthylène, carbonyle et lactone mentionnées à la page 6.

2. Indice de réfraction :

- matériel : . réfractomètre d'Abbe (O. P. L.)
  . propiolactone pure

- mode opératoire :

Opérer à 25º.

Norme : L'indice de réfraction mesuré à 25º doit être voisin de I,4I3.

3. Essai :

a. Recherche et dosage des impuretés acides :

La propiolactone est susceptible de contenir de l'anhydride acétique qui est une impureté de fabrication (49) et surtout de l'acide hydroxy-3 propionique (acide hydracrylique) qui résulte de l'hydrolyse du produit.

La présence d'acide OH-3 propionique en quantité notable dans un échantillon est aisée à vérifier car cette molécule a tendance à se polymériser en acides poly-hydracryliques dont l'aspect caractéristique évolue en fonction du degré de polymérisation : des paillettes translucides en suspension constituent peu à peu un film d'aspect gélatineux sur les parois du récipient, puis des solides d'aspect cireux. L'échantillon examiné devra être parfaitement limpide.

- Dosage des acides totaux :

La méthode de TYLER et BEESING (II5) consiste à titrer l'acidité totale par le méthylate de sodium en milieu alcoolique anhydre en présence de phénolphtaléine. Nous avons essayé cette méthode qui donne un point d'équivalence difficile à saisir aussi bien en utilisant la phénolphtaléine qu'un indicateur potentiométrique (électrode de verre combinée à une électrode de référence).

Nous avons préféré utiliser l'hydroxyde de tétrabutylammonium selon la méthode suivante :

. matériel :

. potentiographe enregistreur Metrohm, type E 336 A
. électrode de verre combinée à une électrode Metrohm de référence Ag/Ag Cl, type EA 246
. méthanol pur anhydre pour analyse
. solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium dans l'isopropanol, de titre T, voisin de 0,I N
. acide benzoïque pour analyses

. mode opératoire :

La prise d'essai exactement pesée (environ 5 mM) est mise en solution dans le méthanol et titrée rapidement à l'aide de l'hydroxyde de tétrabutylammonium préalablement étalonné à l'aide de l'acide benzoïque, soit n ml.

Parallèlement, un essai à blanc est effectué en l'absence de propiolactone, soit n', ml.

(n - n') t = mEq d'acide dans la prise d'essai

Par convention, les résultats sont exprimés en acide OH-3 propionique.

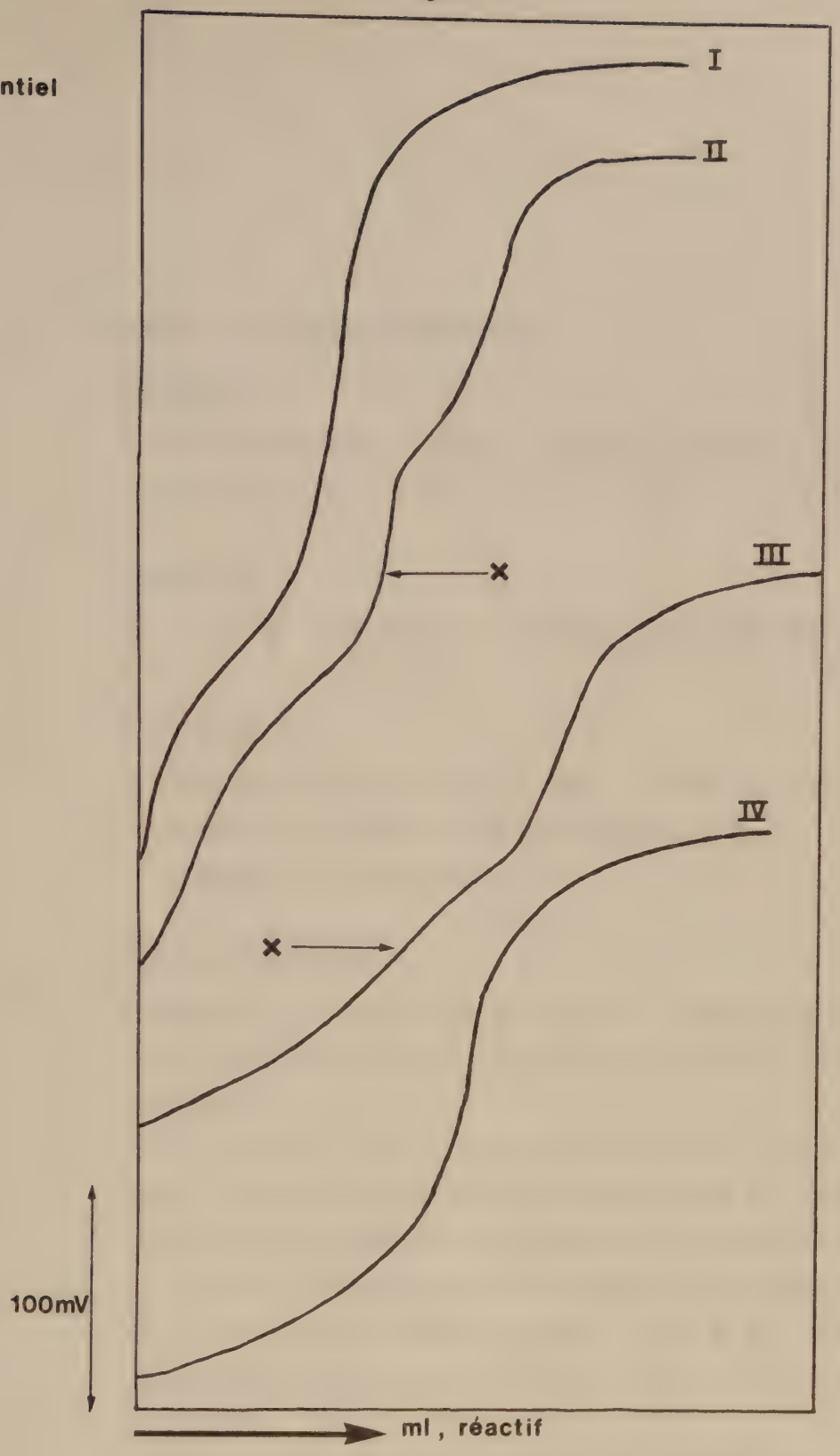
Remarque I : Des essais réalisés à l'aide du potentiographe enregistreur à diverses vitesses (qui ont permis de faire varier le temps du dosage entre 5 et 70 minutes) ont montré que, dans les conditions opératoires choisies, les résultats sont reproductibles et que la propiolactone ne réagit pas avec l'ammonium quaternaire.

Remarque 2 : On constate pour les échantillons de propiolactone les plus dégradés, la présence de deux points d'équivalence (figure 2 page 26). Nous avons vérifié que l'anhydride acétique, l'acide acrylique et l'acide hydroxy 3-propionique (72), seuls ou en mélange, ne donnent qu'un seul point d'équivalence, lors du dosage. Nous avons pu vérifier que les acides polyhydroxypropioniques sont titrables et sont à l'origine du second point d'équivalence observé. Ceci explique la discordance entre le titre en propiolactone obtenu (voir infra, page 28) à l'aide du thiosulfate et le dosage des acides totaux.

b. densité :

La densité mesurée à + 20º doit être proche de I,I46.

Figure 2



DOSAGE DES ACIDES TOTAUX DANS LA PROPIOLACTONE

I Propiolactone redistillée - essai après 4 semaines de conservation -

II Propiolactone 'commerciale' - essai après 2 ans de conservation -

III Propiolactone 'commerciale' - essai après 6 mois de conservation -

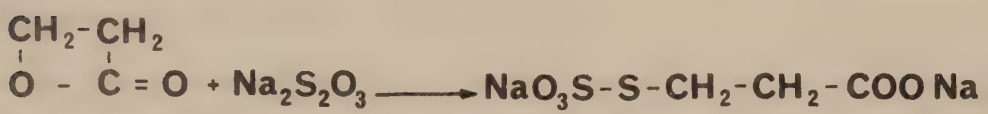
IV Acide acrylique - Acide hydracrylique

× Acide polyhydracrylique

4. Dosage de la propiolactone :

- principe :

La propiolactone réagit quantitativement avec le thiosulfate en milieu aqueux selon la réaction :



- réactifs :

. thiosulfate de titre connu, voisin de 0,4 N
. solution titrée d'iode, environ 0,2 N
. phosphate dipotassique 2 M

- mode opératoire :

Dissoudre une prise d'essai (P) contenant environ 5 mM de propiolactone dans un excès connu de thiosulfate (IO mM).

Si la prise d'essai contient plus de 20 % d'acides totaux, il est nécessaire de tamponner à l'aide de la solution de phosphate dipotassique. L'excès de thiosulfate est titré après IO à 20 minutes de contact à l'aide de la solution titrée d'iode, soit N ml. Parallèlement un essai à blanc est réalisé, soit n ml de thiosulfate utilisés.

La teneur en propiolactone est donnée par la relation :

$$\frac{(N - n)\ t \times 7,206}{P \times 0,995}$$

Remarque : 0,995 est un facteur de correction proposé par TYLER et BEESING (II5) qui tient compte de l'interférence possible de l'acide acrylique éventuellement présent.

Résultats obtenus : (tableau V)

Nous avons constaté des différences notables en fonction de la provenance des échantillons, aussi, pour notre étude, nous avons préalablement redistillé la propiolactone sous pression réduite.

TABLEAU V

Echantillon	I		2		3	
	brut	distillé	brut	distillé	brut	distillé
indice de réfraction	I,4I6	I,4I3	I,4I7	I,4II	I,4I3	I,4II
densité	I,I62	I,I55	I,I57	I,I56	I,I56	I,I55
acidité totale	I,47%	0,55%	I,8%	0,36%	0,99%	0,47%
propiolactone	92,9%	96,7%	87,2%	99,3%	93,3%	97,3%

CHAPITRE IV

POLAROGRAPHIE DE LA PROPIOLACTONE

CHAPITRE IV

POLAROGRAPHIE DE LA PROPIOLACTONE

A. POLAROGRAPHIE DIRECTE DE LA PROPIOLACTONE EN PRESENCE D'IODURE DE TETRAMETHYLAMMONIUM :

- principe :

L'iodure de tétraméthylammonium est couramment utilisé pour la polarographie des composés difficilement réductibles dans les conditions habituelles (6I). Cet adjuvant permet en effet d'étudier les phénomènes de réduction dans une zone de potentiels difficiles à atteindre avec les électrolytes-supports classiques (jusqu'à - 2,3 V). Son emploi a été préconisé par divers auteurs (74.76. III.II2.II3) pour l'étude polarographique de quelques lactones. Nous avons pensé que l'emploi de cet adjuvant était possible dans le cas de la propiolactone.

- matériel et réactifs :

- . polarographe Metrohm Polarecord, type E 26I
  . contrôleur de gouttes force IO, cadence I,(type E 3545)
  . temps de goutte : 0,23 à 0,26 s
  . capillaire EA 853
  . électrode de référence Ag/AgCl EA 4I9
  . hauteur du mercure : 56 cm
  . débit du mercure : 3,5I2 mg/seconde
- iodure de tétraméthylammonium qualité pour polarographie origine Merck - lot 70 222 777
- eau distillée

- propiolactone fraîchement distillée sous pression réduite
- azote desséché

- mode opératoire :

Préparer une solution renfermant une quantité exactement connue de propiolactone (environ 3 mg/ml) dans une solution aqueuse d'iodure de tétraméthylammonium 0,I M. Procéder, après dégazage de l'azote, à la mesure polarographique entre - 0,5 V et - I,5 V.

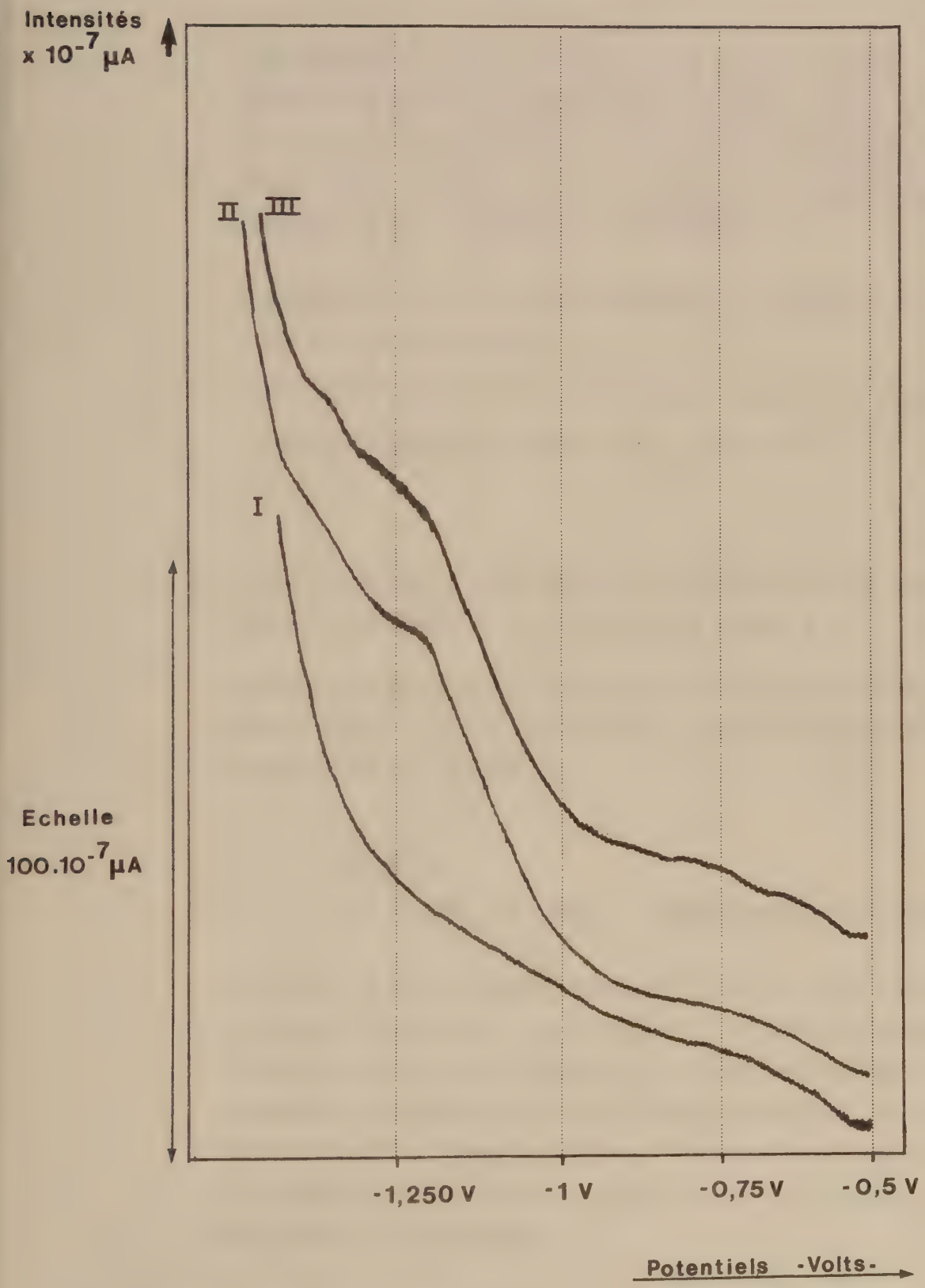
- résultats obtenus :

En présence de propiolactone, il apparaît une vague de réduction nette, de potentiel de demi-vague égal à - I,I07 V (figure 3 page 32). Pour une concentration finale de 2,9 mg/ml, l'intensité du courant de réduction est de $5I \times I0^{-7}$ µA. Cette valeur est nettement inférieure à celle obtenue, avec le nitropropionate de sodium dont nous étudions plus loin le comportement polarographique.
Il convient également de noter que la propiolactone est instable en milieu alcalin et réagit avec les sels d'ammonium (32). Nous avons observé la disparition complète de la vague de réduction après 45 minutes de contact avec l'iodure de tétraméthylammonium sous agitation énergique par barbotage d'azote.
Toutefois, si l'on opère en dégazant l'électrolyte-support avant l'addition de la prise d'essai, la mesure

POLAROGRAPHIE DE LA PROPIOLACTONE DANS

L'IODURE DE TETRAMETHYLAMMONIUM

FIGURE 3



I Iodure de tétraméthylammonium

II Iodure de tétraméthylammonium + propiolactone

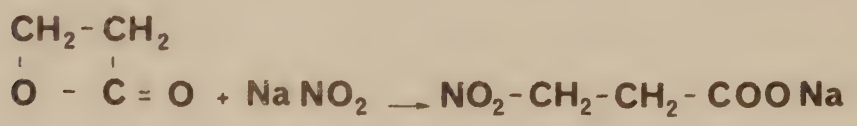
III Iodure de tétraméthylammonium + propiolactone après 30 minutes de contact

est possible dans un délai de 30 à 40 minutes. L'emploi de la méthode polarographique directe, pour le contrôle de la propiolactone, ne présente qu'un intérêt limité. Dans un tel cas, il convient de respecter scrupuleusement les conditions suivantes :

- dégazage de l'électrolyte-support avant introduction de la prise d'essai
- homogénéisation par barbotage d'azote (I minute)
- mesure immédiate entre -0,5 et -I,5 V.

B. MISE AU POINT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA PROPIOLACTONE PAR POLAROGRAPHIE DE SON DERIVE NITRE :

Parmi les réactions chimiques de la propiolactone, nous avons pensé que la formation de nitropropionate de sodium selon la réaction :



méritait d'être transposée sur le plan analytique pour l'identification et le dosage de la propiolactone. Les dérivés nitrés sont aisément polarographiables et le courant de réduction observé est remarquable par son intensité. La mise au point d'une telle méthode exigeait en préalable, l'étude du dérivé nitré que nous avons été amené à préparer.

Aussi, notre étude est divisée en trois parties :

I. Préparation et isolement de l'acide nitropropionique

2. Etude du comportement polarographique de son sel de sodium

3. Mise au point de la méthode d'identification et de dosage de la propiolactone.

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

I. PREPARATION ET ISOLEMENT DE L'ACIDE NITRO-PROPIONIQUE ET DE SON SEL DE SODIUM :

La préparation des dérivés nitro-aliphatiques à fait l'objet de nombreux travaux (62.67.89) dont les plus anciens sont dus à Victor MEYER. Le principe général consiste à faire réagir un halogénure d'alcoyle avec le nitrite d'argent. La propiolactone en particulier, réagit aisément avec le nitrite de sodium en solution aqueuse concentrée (48) pour former le nitropropionate de sodium. Il faut noter au passage que ce produit existe dans la nature et constitue le principe toxique d'un indigo (Indigofera endecaphylla Jacq) (75).

Pour notre part, nous avons utilisé une technique de préparation voisine du procédé décrit par GRESHAM (48).

- <u>réactifs</u> :

  - nitrite de sodium pur pour analyse
  - propiolactone fraîchement distillée
  - éther pur pour analyse
  - acide chlorhydrique R. P.
  - carbonate acide de sodium R. P.

- mode opératoire :

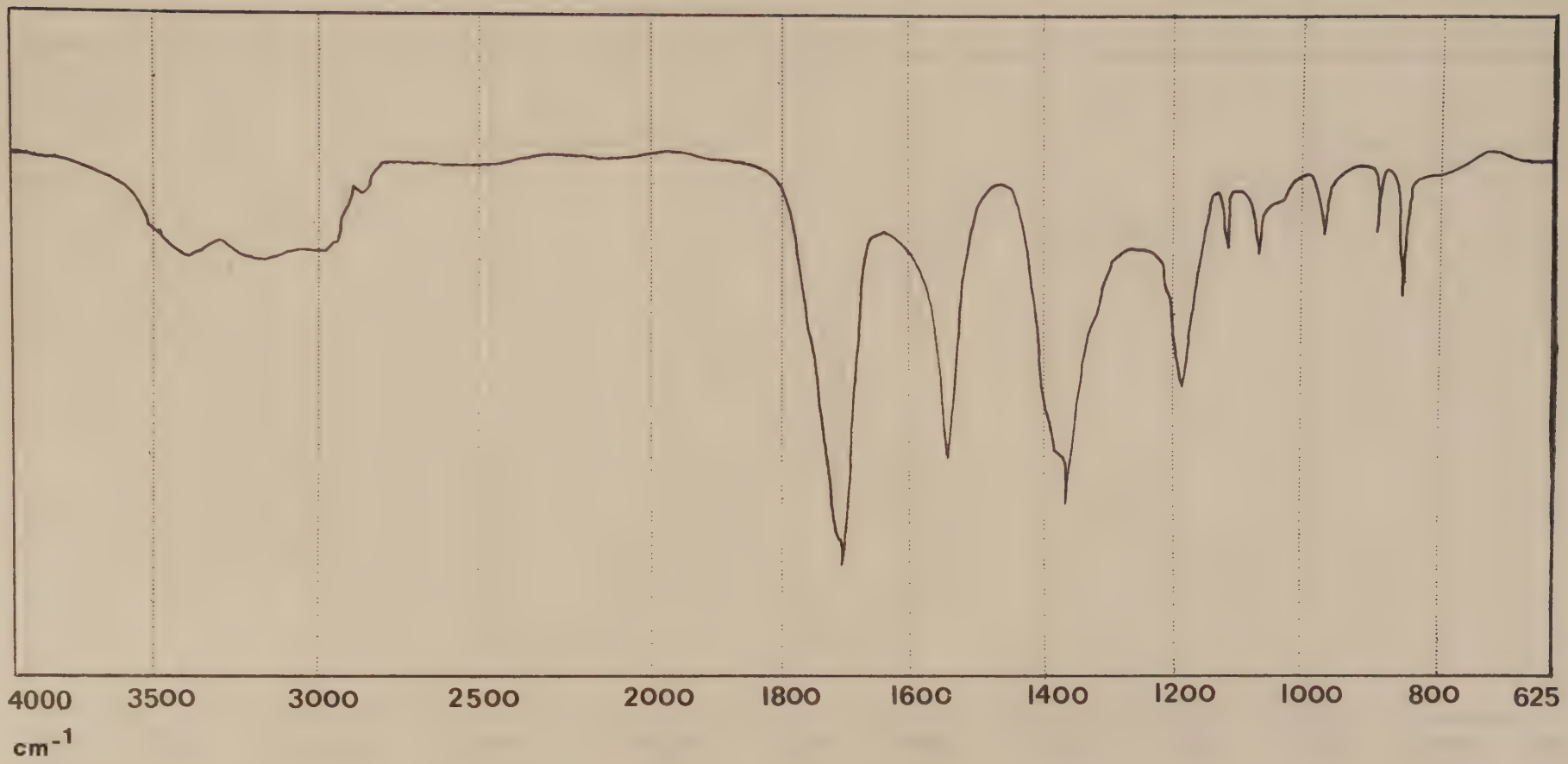
A une solution aqueuse saturée de nitrite de sodium, ajouter lentement la propiolactone en maintenant la température au-dessous de 40 à 50º. La réaction, lente d'abord, a tendance à devenir brutale et exothermique et il est nécessaire d'ajouter la propiolactone avec prudence. En fin de réaction le mélange présente une coloration acajou foncé.

Purification :

Amener le mélange réactionnel à pH 2 par affusion progressive d'acide chlorhydrique et procéder à l'extraction de l'acide nitropropionique par l'éther. Les extraits éthérés sont réunis puis agités avec une phase aqueuse contenant du carbonate acide de sodium, en quantité suffisante pour amener le pH à 7,5 - 7,8. La phase aqueuse alcaline est ensuite récupérée puis acidifiée et extraite à l'éther. Une partie aliquote de la phase éthérée est conservée pour isoler l'acide nitropropionique par évaporation. Le restant de la phase éthérée est à nouveau mis en contact avec une phase aqueuse alcaline.
Cette phase aqueuse alcaline qui contient le nitropropionate de sodium peut être concentrée par évaporation sous vide.

L'acide nitropropionique se présente sous forme de petits cristaux jaune foncé, dont l'intervalle de fusion est de 67 - 68º.

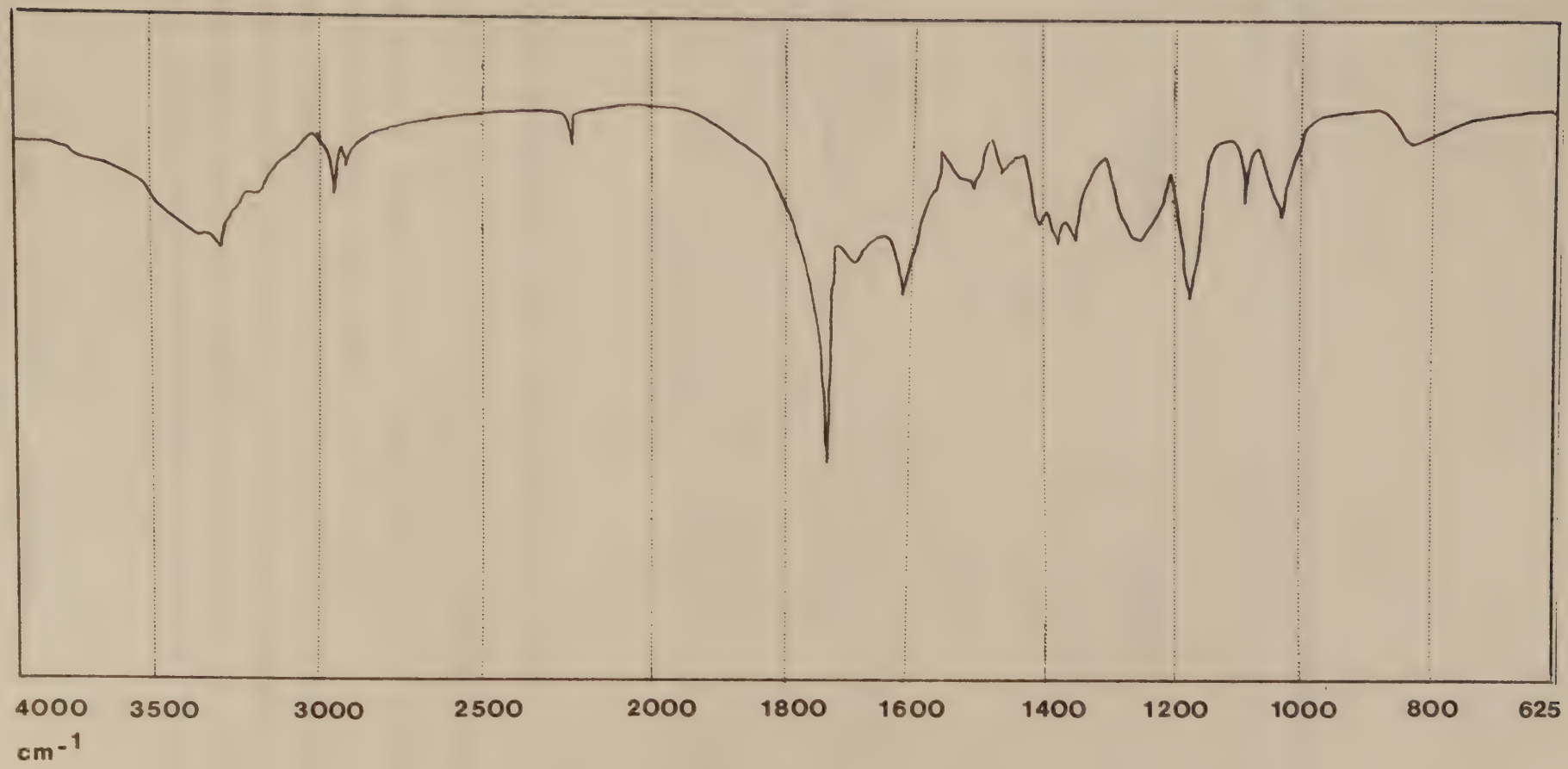
Figure 4



ACIDE NITROPROPIONIQUE

spectre infra-rouge

Figure 5



NITROPROPIONATE DE SODIUM

spectre infra-rouge

L'analyse élémentaire nous a donné les résultats suivants :

% calculé	% trouvé
C : 25,56	25,29
H : 2,83	2,9I
N : 9,93	I0,05

L'examen du spectre dans l'infra-rouge en pastille de KBr est caractéristique (figure 4 page38). Le nitropropionate de sodium se présente sous forme d'un liquide huileux, brun jaunâtre, les caractéristiques de son spectre dans l'infra-rouge sont comparables à celles de l'acide (figure 5 page39).

II. POLAROGRAPHIE DU NITRO-PROPIONATE DE SODIUM :

I. Généralités sur la polarographie des dérivés nitrés :

Les dérivés nitrés ont un comportement polarographique caractéristique bien connu (3.I0I.I08).
Leur réduction à l'électrode à goutte de mercure s'effectue en deux étapes et permet d'observer deux vagues de réduction caractéristiques. La première correspond à la réduction jusqu'au stade hydroxylamine selon la réaction suivante :

$$R - NO_2 \xrightarrow[H_2O + 4H^{\oplus}]{4\,e^{\ominus}} RNHOH$$

Cette réaction de réduction met en jeu 4 électrons ce qui est particulièrement intéressant pour une application analytique étant donné l'intensité du courant mesuré.
Le potentiel de demi-vague varie peu en fonction du pH.
La seconde vague correspond à la réduction de l'hydroxylamine en amine :

$$R\text{-}NHOH \xrightarrow[H_2O + 3H^{\oplus}]{2\,e^{\ominus}} R\,NH_3^{\oplus}$$

Cette vague de réduction qui met en jeu 2 électrons s'observe seulement en milieu suffisamment alcalin, car son potentiel de demi-vague se situe vers - I,5 V.
Enfin, pour les pH fortement alcalins, les dérivés nitrés ne sont plus réductibles (26.73.86)

2. Partie expérimentale :

Nous avons procédé aux mesures suivantes :

- mesure de l'intensité du courant de réduction et du potentiel de demi-vague, en fonction du pH (tableau VII page 43)
- au pH optimum : mesure de l'intensité du courant de réduction en fonction de la concentration (tableau VIII page 48).
- mesure de l'intensité du courant de réduction en fonction de la hauteur de colonne de mercure (tableau IX page 51).

- matériel :

  . polarographe Metrohm Polarecord, type E 26I
  . contrôleur de gouttes, référence : E 354 S,
  (force IO, cadence I)
  temps de goutte : 0,23 à 0,26 s
  . capillaire Metrohm EA 853
  . électrode de référence Ag/Ag Cl EA 4I9
  . hauteur du mercure (H) précisée pour chaque essai
  . débit du mercure 3,3I2 mg/seconde (pour H = 560 mm)
  . ammortissement des oscillations : 0
  . contre-tension : 0

- réactifs :

  . solutions tampon

TABLEAU VI

	pH 5	pH 6	pH 7	pH 7,5	pH 8
KH_2PO_4	I8,0 g	I5,9 g	7,0 g	I,8I4 g	0,6I g
$Na_2HPO_4 \cdot {}_{12}H_2O$	0,I2 g	2,87 g	I4,52 g	I9,04 g	22,92 g
Eau q. s. p.	I litre	I litre	I litre	I litre	I litre

  . nitropropionate de sodium.

a) Etude de la variation de l'intensité du courant de réduction en fonction du pH :

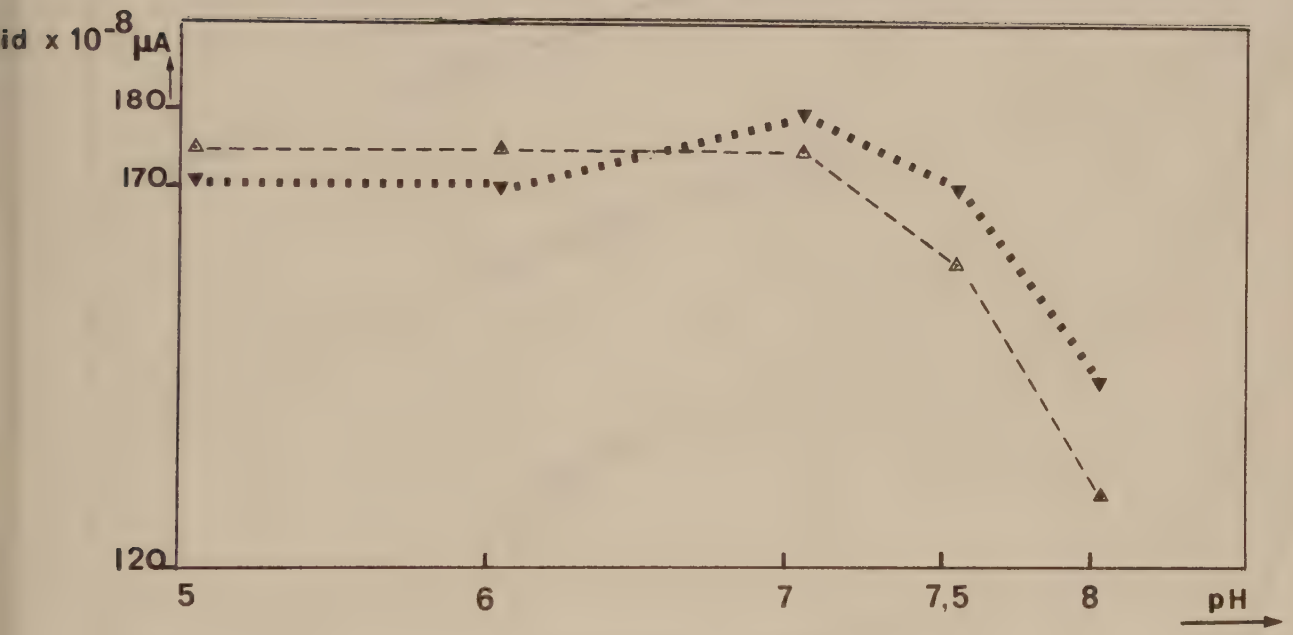
Dissoudre une prise d'essai de IO mg dans IO ml d'eau distillée ; prélever I ml et ajouter I4 ml de solution tampon (le volume final de I5 ml choisi est le volume minimal nécessaire pour l'utilisation de la cellule de mesure polarographique). Après dégazage de la solution par barbotage d'azote pendant 5 minutes, enregistrer l'intensité (i_d) du courant de réduction entre 0 et - 2 V. Les résultats (tableau VII) ont été obtenus à la concentration finale de 66,6 µg de nitropropionate de sodium pour I ml de solution.

(Hauteur de mercure : 4IO mm)

TABLEAU VII

pH	intensité $i_d \times IO^{-8}$ µA temps 0	$E_{\frac{1}{2}}$ (V) potentiel ½ vague	intensité $i_d \times IO^{-8}$ µA après 60 mn
5	I70	- 0,298	I75
6	I70	- 0,368	I75
7	I80	- 0,455	I75
7,5	I70	- 0,480	I60
8	I45	- 0,5I2	I30

Figure 6



POLAROGRAPHIE DU NITROPROPIONATE DE SODIUM : ETUDE DE L'INFLUENCE DU pH

△_____ Mesure au temps zéro

▼..... Mesure après 60 minutes

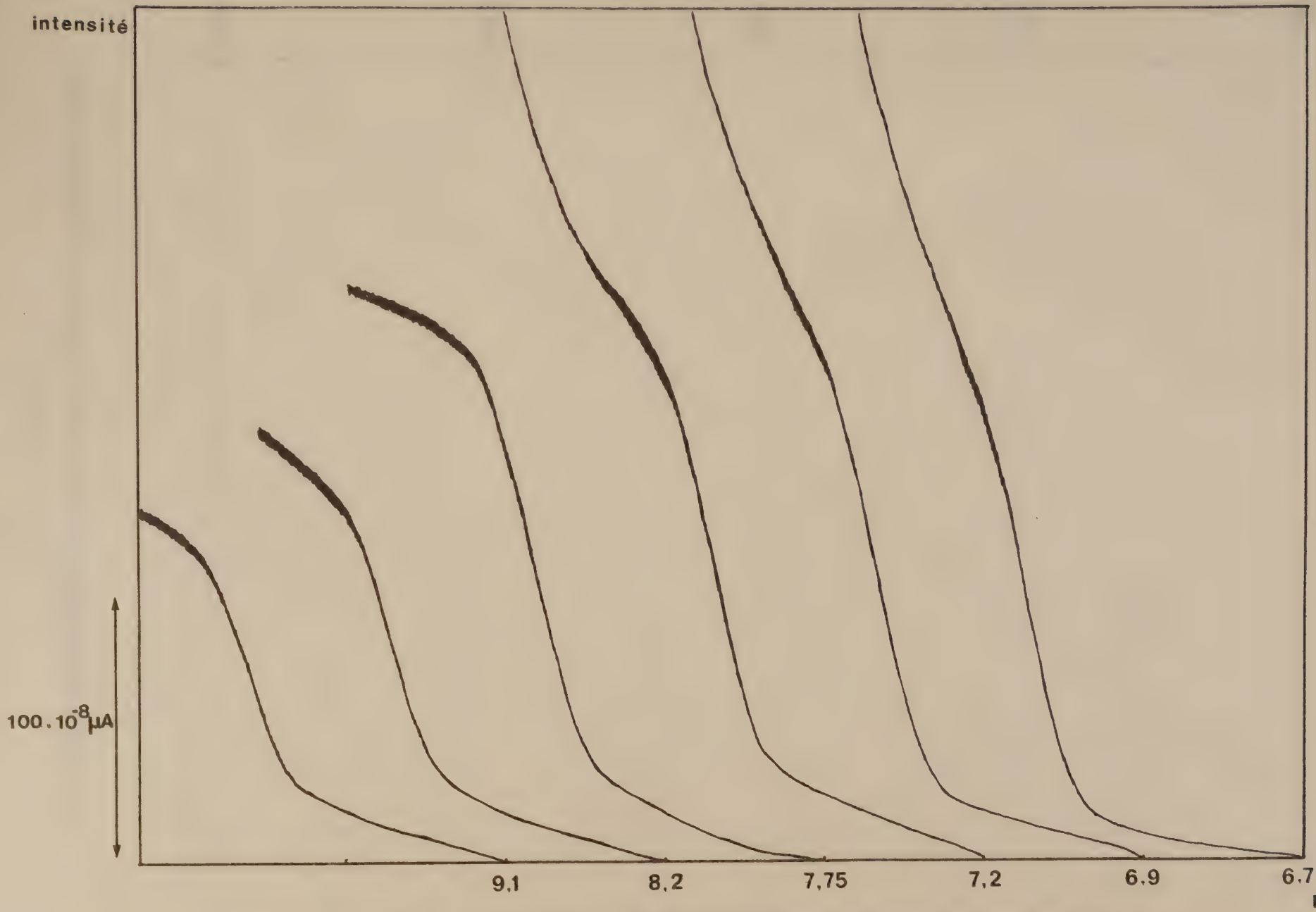
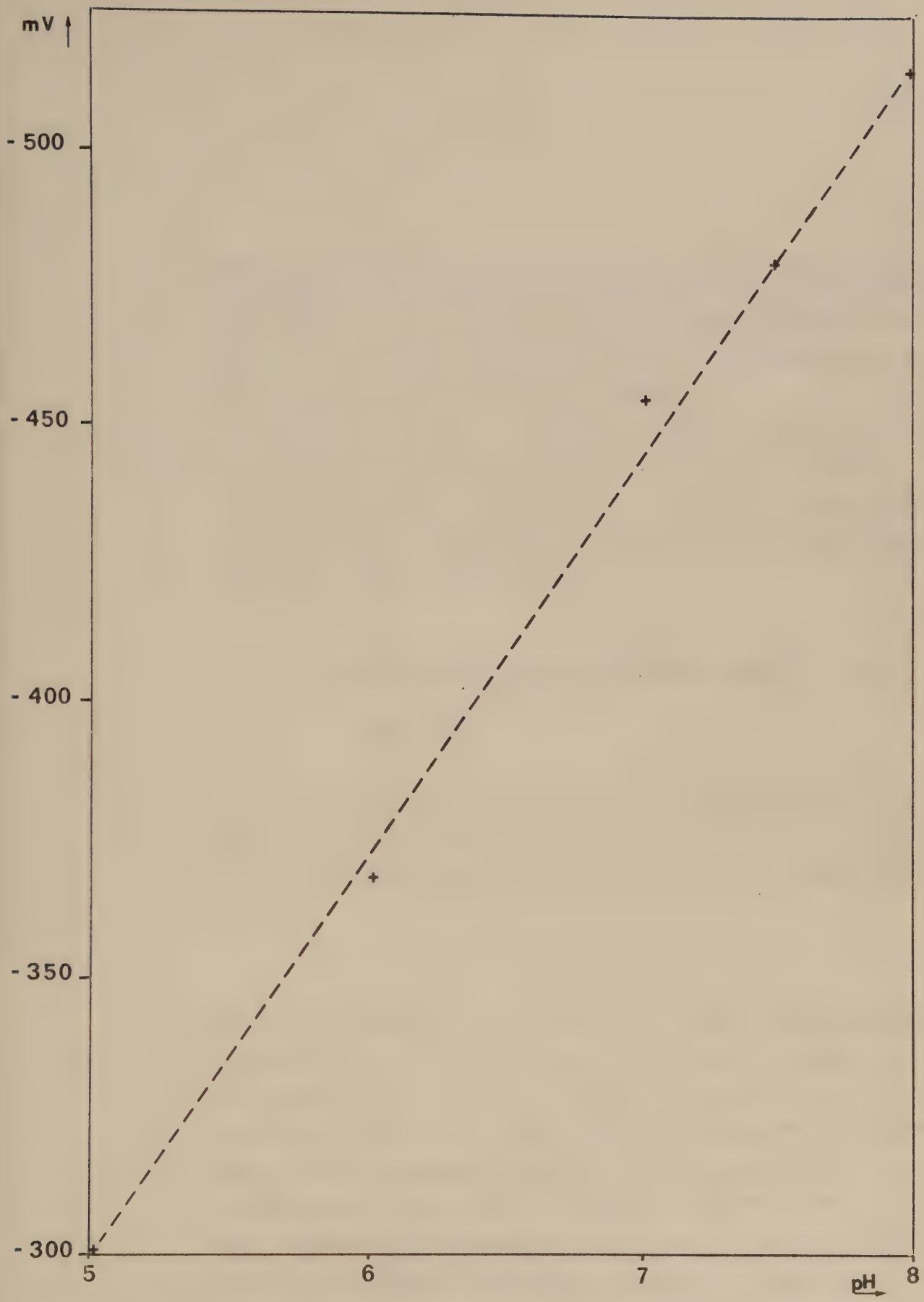


Figure 7

Evolution des courbes de réduction du nitropropionate de sodium en fonction du pH

Figure 8



Nitropropionate de sodium : évolution du potentiel de demi-vague en fonction du pH

L'intensité du courant de réduction varie très faiblement entre pH 5 et pH 7,5 avec un léger maximum à pH 7 tandis qu'en milieu alcalin (pH 8), l'intensité du courant de diffusion diminue sensiblement.
Les mêmes solutions, examinées après 60 minutes de contact avec l'électrolyte support demeurent stables.
La diminution de l'intensité du courant de réduction peut s'expliquer par l'existence de deux formes tautomères du dérivé nitré (6.57.58.80)

$$R - H_2C - NO_2 \rightleftharpoons \left[RHC = NO_2\right]^{\ominus} + H^{\oplus}$$

'NITRO' 'ACI'

En milieu basique, les dérivés nitro-aliphatiques se comportent donc comme des pseudo-acides et la forme "aci" n'est pas réductible à l'électrode à goutte de mercure

Enfin, le potentiel de demi-vague varie régulièrement en fonction du pH et atteint des valeurs de plus en plus négatives au fur et à mesure que le milieu devient alcalin, ce qui est normal pour un processus de réduction électrochimique mettant en jeu des protons.
Il faut noter que nous nous sommes attaché à étudier uniquement la première vague de réduction du dérivé nitré ; on constate néanmoins (figure 11 page 57) qu'à partir d'un pH alcalin (pH 7,5) apparaît la seconde vague

dont la hauteur est faible et ne présente d'intérêt que par le fait qu'elle confirme que la mesure électrochimique met bien en jeu la réduction d'un dérivé nitré.

b) Mesure de l'intensité du courant de réduction en fonction de la concentration :

Nous avons opéré en tampon pH 7,5 avec des concentrations finales de I4,5 à 2I7 µg/ml

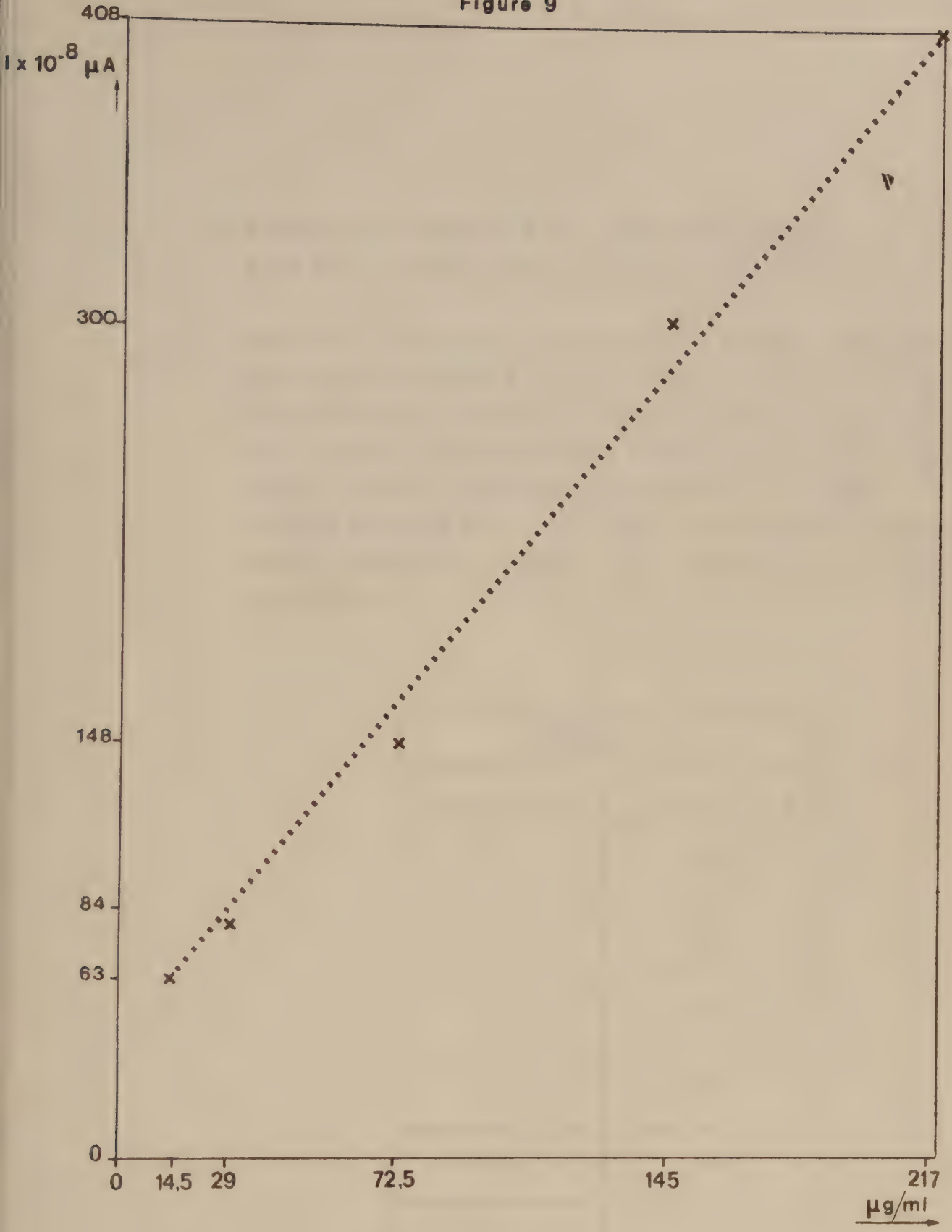
(Hauteur de mercure : 400 mm)

TABLEAU VIII

µg/ml	i_d x 10^{-8} µA
I4,5	63
29	84
72,5	I48
I45	300
2I7	408

La représentation graphique de ces résultats et la comparaison de moyennes de plusieurs mesures montrent une bonne corrélation entre la concentration et l'intensité mesurée (graphique 9 page 49).

Figure 9



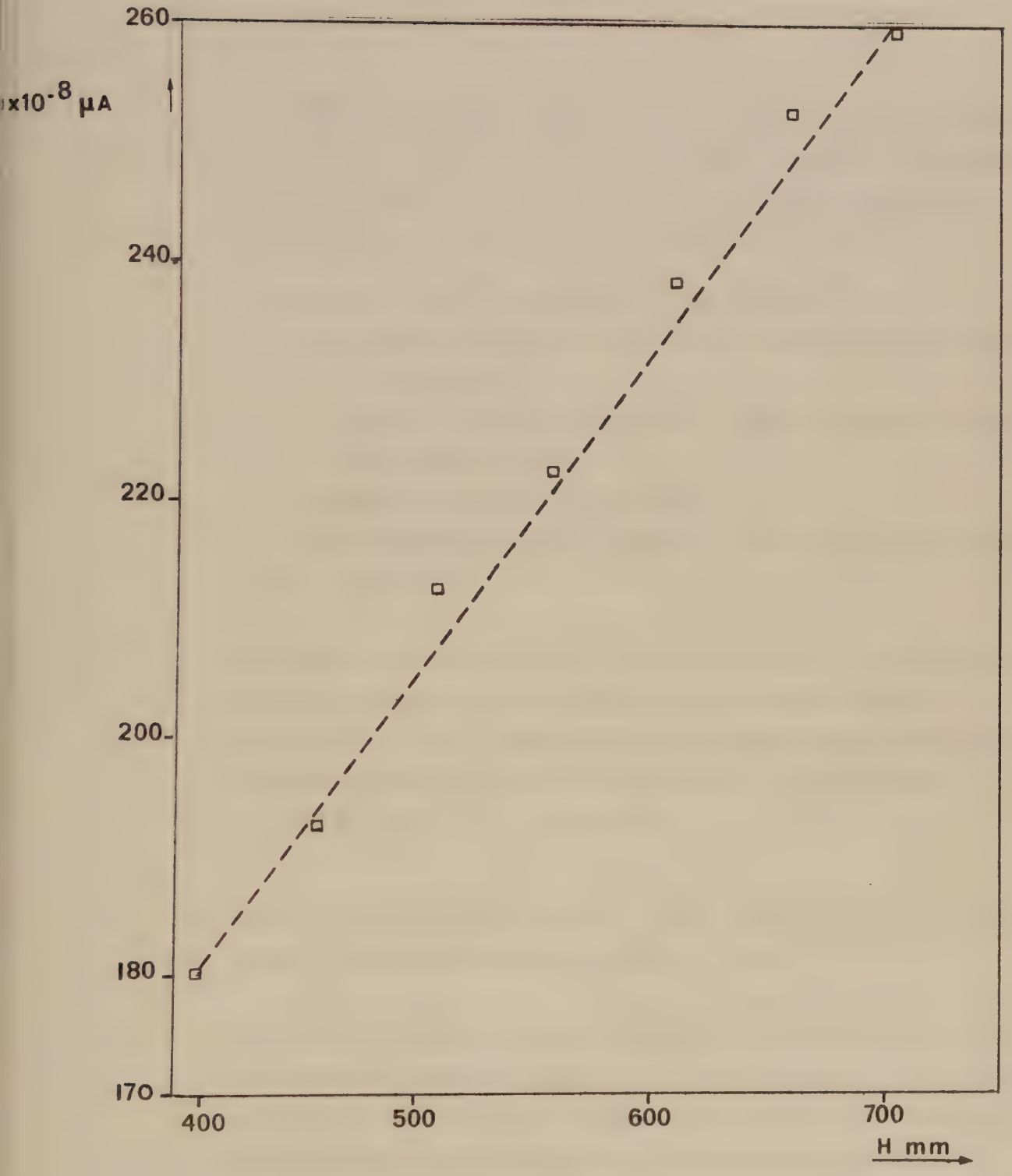
Variation de l'intensité du courant de réduction en fonction de la quantité de nitropropionate de sodium

c) Mesure de l'intensité du courant de réduction en fonction de la hauteur de la colonne de mercure :

Dans des conditions identiques aux essais précédents, nous avons procédé à plusieurs séries de mesures dont les résultats confirment que l'arrivée à l'électrode de l'espèce électrochimique réductible est régie uniquement par un phénomène de diffusion. En effet, (figure 10 page 51), il existe une relation linéaire entre l'intensité obtenue et la hauteur de la colonne de mercure :

TABLEAU IX	
hauteur (mm)	id x 10^{-8} µA
410	180
460	196
510	212
560	222
610	238
660	252
710	260

Figure 10



Mesure du courant de réduction du nitropropionate de sodium

pour diverses hauteurs de la colonne de mercure

Ces résultats permettent, compte tenu du débit du mercure par le capillaire et du temps de goutte de calculer la constante de diffusion de nitropropionate de sodium par application de l'équation d'ILKOVIC :

- $i_d = 6,07 \times 10^4 \times n \times m^{2/3} \times t^{1/6} \times D^{1/2} \times C$
- n = nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction de réduction
- m = poids de mercure débité chaque seconde par le capillaire (en mg)
- D = coefficient de diffusion
- C = concentration de l'espèce électroactive en moles/ml
- id = ampères

En tampon phosphate pH 7, le coefficient de diffusion du nitropropionate de sodium a été trouvé égal à $7,9.10^{-5}$ $cm^2.s^{-1}$, ce qui est en bonne concordance avec les données publiées pour l'acide nitro-3 propionique ($7,23.10^{-5}$ $cm^2.s^{-1}$) - (76 bis).

d) Etude de l'influence de la force ionique sur le comportement électrochimique du dérivé nitré :

Une prise d'essai de 24,6 mg de nitropropionate de sodium a été dissoute dans 100 ml de tampon pH 7,5 puis, à 2 ml de la dilution obtenue on a ajouté des quantités croissantes d'une solution d'acétate de sodium à 50 % et ajusté à volume constant à l'aide du tampon. Les résultats (tableau X) ont été obtenus dans des conditions de mesure inchangées (voir page 42), hauteur du mercure : 40 cm.

TABLEAU X				
Nitropropionate de sodium µg/2ml	492	492	492	492
Acétate de sodium 50 % ml	I	2	5	I0
Tampon pH 7,5 ml	I7	I6	I3	8
Nitropropionate de sodium µg/ml	24,6	24,6	24,6	24,6
i_d x $I0^{-8}$ µA	72	74	73	69

Ces résultats montrent que l'influence de la force ionique du milieu paraît négligeable.

e) Conclusion :

L'ensemble des essais effectués dans des conditions variées, montre que la polarographie permet une identification aisée du nitropropionate de sodium ainsi que son dosage.

L'étude expérimentale effectuée nous a permis d'établir les conditions optimales de travail :

. prise d'essai de l'ordre de I0 à 20 µg/ml

. pH compris entre 5 et 7,5

C. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'IDENTIFICATION ET DE DOSAGE DE LA PROPIOLACTONE : ETUDE DES CONDITIONS OPERATOIRES :

Les résultats de la polarographie du nitropropionate de sodium nous ont incité à appliquer la réaction de formation de ce composé pour l'identification et le dosage de la propiolactone car :

. le comportement polarographique caractéristique du dérivé nitré permet d'espérer un minimum d'interférences de la part d'autres composés éventuellement présents,

. l'intensité du courant de réduction de la première vague (à 4 électrons) permet une bonne sensibilité, la limite de détection (IO µg/ml) étant fonction de la sensibilité du système de mesure et de la nature de l'échantillon examiné,

. le dérivé nitré paraît peu sensible aux variations de la force ionique du milieu, ce qui permet d'utiliser des solutions tampon fortement concentrées afin d'éviter de trop grandes variations du pH lors de l'addition d'échantillons de propiolactone plus ou moins hydrolysée.

I. Méthode proposée :

a) Matériel et méthodes de mesure :

(voir page 42).

b) Réactifs :

. solution étalon de propiolactone : nous avons utilisé des solutions aqueuses mais il est tout à fait possible d'utiliser des solutions extemporanées dans l'alcool.

. solution de nitrite de sodium : solution de nitrite de sodium 4 M dans le tampon pH 7,5

c) Mode opératoire :

A une prise d'essai renfermant IO à IOO µg de propiolactone, ajouter 5 ml de solution de nitrite de sodium 4M et ajuster à 20 ml à l'aide du tampon pH 7,5. Laisser en contact 30 minutes à la température du laboratoire. Le temps de réaction peut être ramené à IO minutes en élevant la température à 40/50º C. Effectuer parallèlement la détermination avec une solution étalon de propiolactone. La formation de nitropropionate de sodium se traduit par un jaunissement de la solution.
Dans le cas des solutions fortement concentrées en propiolactone, il est possible de diluer, après réaction, le mélange à l'aide du tampon pH 7,5 sans inconvénient.

d) Mesure du courant de réduction :

Dégazer au préalable le mélange réactionnel par barbotage d'azote desséché pendant dix minutes puis enregistrer les variations d'intensité du courant de réduction entre 0 et - 2 V et évaluer l'intensité de la vague de réduction, soit par la mesure de la hauteur de la vague comprise entre les deux paliers, soit par la mesure

de la hauteur du pic observé si l'enregistrement est effectué en différentielle. En règle générale, l'intensité du courant mesuré est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} µA.

2. Justification de la méthode proposée :

a) Influence du pH :

Nous avons effectué plusieurs séries d'essais qui nous ont permis de constater la nécessité d'effectuer la réaction et le dosage polarographique en solution tampon. En effet, les résultats obtenus en solution non tamponnée ne sont pas reproductibles pour les raisons suivantes :

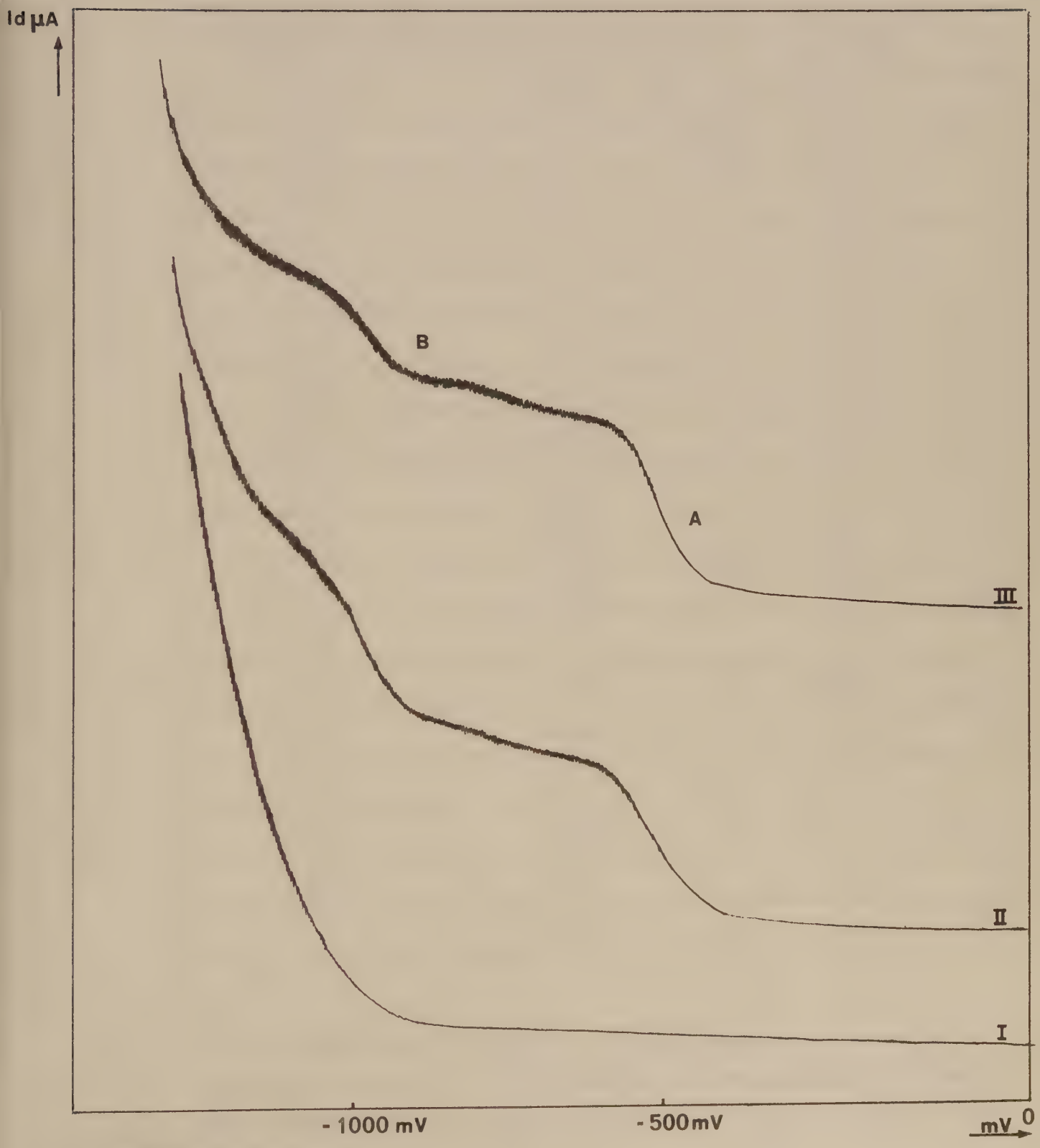
- en pH nettement acide (pH 5), il se forme l'acide nitreux, réductible à l'électrode à goutte de mercure (3). D'autre part, la vague de réduction du dérivé nitré tend à se confondre avec celle de la réduction des protons.

- en pH alcalin (pH 8), la propiolactone risque de s'hydrolyser rapidement et de toute façon, le dérivé nitré est alors sous sa forme "aci", non réductible.

Il faut également tenir compte du fait que l'échantillon à examiner contient toujours de l'acide hydracrylique.

Figure 11

REDUCTION POLAROGRAPHIQUE DU NITROPROPIONATE DE SODIUM



I Nitrite de sodium seul

II Propiolactone après réaction avec le nitrite de sodium à pH 7,5

III Nitropropionate de sodium à pH 8 { A $R-NO_2 \rightarrow RNHOH$; B $R-NHOH \rightarrow RNH_2$

ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN NITRITE DE SODIUM SUR LE pH DES SOLUTIONS TAMPONS :

TABLEAU XI		
Tampon pH 8 20ml	Tampon pH 7 20ml	pourcentage $Na\ NO_2$
7,96	6,82	0
7,84	6,70	I,3I
7,78	6,6	2,5
7,75	6,54	3,6
7,72	6,48	4,6
7,72	6,43	5,52
7,7I	6,4	6,369
7,70	6,36	7,I55
7,69	6,34	7,88
7,68	6,32	8,56
7,68	6,30	9,2
7,68	6,28	9,79
7,67	6,26	I0,35
7,66	6,24	I0,87
7,66	6,I9	II,45
7,66	6,I8	II,82
7,655	6,I7	I2,26
-	6,I6	I2,68

Nous avons montré (page 43) l'importance du pH pour la mesure du courant de réduction du nitropropionate de sodium. Par ailleurs, il est indispensable d'opérer la préparation

du nitropropionate de sodium à l'aide d'une solution aussi concentrée que possible en nitrite de sodium afin d'avoir un rendement convenable. Nous avons constaté une modification non négligeable du pH des solutions tampon utilisées en fonction du pourcentage de nitrite de sodium ajouté (tableau XI page 58). Afin de pallier cet inconvénient, nous avons utilisé des solutions de nitrite de sodium préparées à l'aide du tampon adéquat.

Les résultats obtenus (tableau VII page 43) montrent que le pH adéquat est situé entre pH 7 et pH 7,5, tant pour la réaction proprement dite que pour la mesure du courant de réduction.

b) Etude de l'influence de la concentration en nitrite de sodium sur le rendement de la réaction :

L'influence sur le pH de la quantité de nitrite de sodium ajoutée a été étudiée précédemment (voir page 58). Nous avons opéré dans les conditions habituelles de concentration, température et mesure .

- prise d'essai : I ml propiolactone I p. I 000 V.V/eau
- nitrite de sodium 4 M 0 à I5 ml
- tampon pH 7,5 qs volume constant 20 ml
- temps de contact : 30 minutes à température ambiante.

Les résultats obtenus (tableau XII page 60) montrent que la concentration optimale en nitrite se situe vers 20 mMoles pour I,59 micromole de propiolactone, soit 5 ml Na NO_2 , 4 M. Au-delà d'une certaine quantité de

nitrite (36 à 40 mMoles pour IO ml de tampon), on constate une diminution de l'intensité du courant de réduction due à la variation du pH de la solution sous l'action du nitrite de sodium. Compte tenu de ces observations, nous avons choisi d'utiliser une solution 4 M de nitrite de sodium en tampon pH 7,5.

(Hauteur de mercure : 7IO mm)

TABLEAU XII

Nitrite de sodium 4 M ml pour 20 ml de solution finale	Intensité mesurée x 10^{-8} µA
0	0
I	70
2	240
3	300
4	400
5	550
6	550
7	550
8	550
9	550
I0	520
II	490
I2	470
I5	430

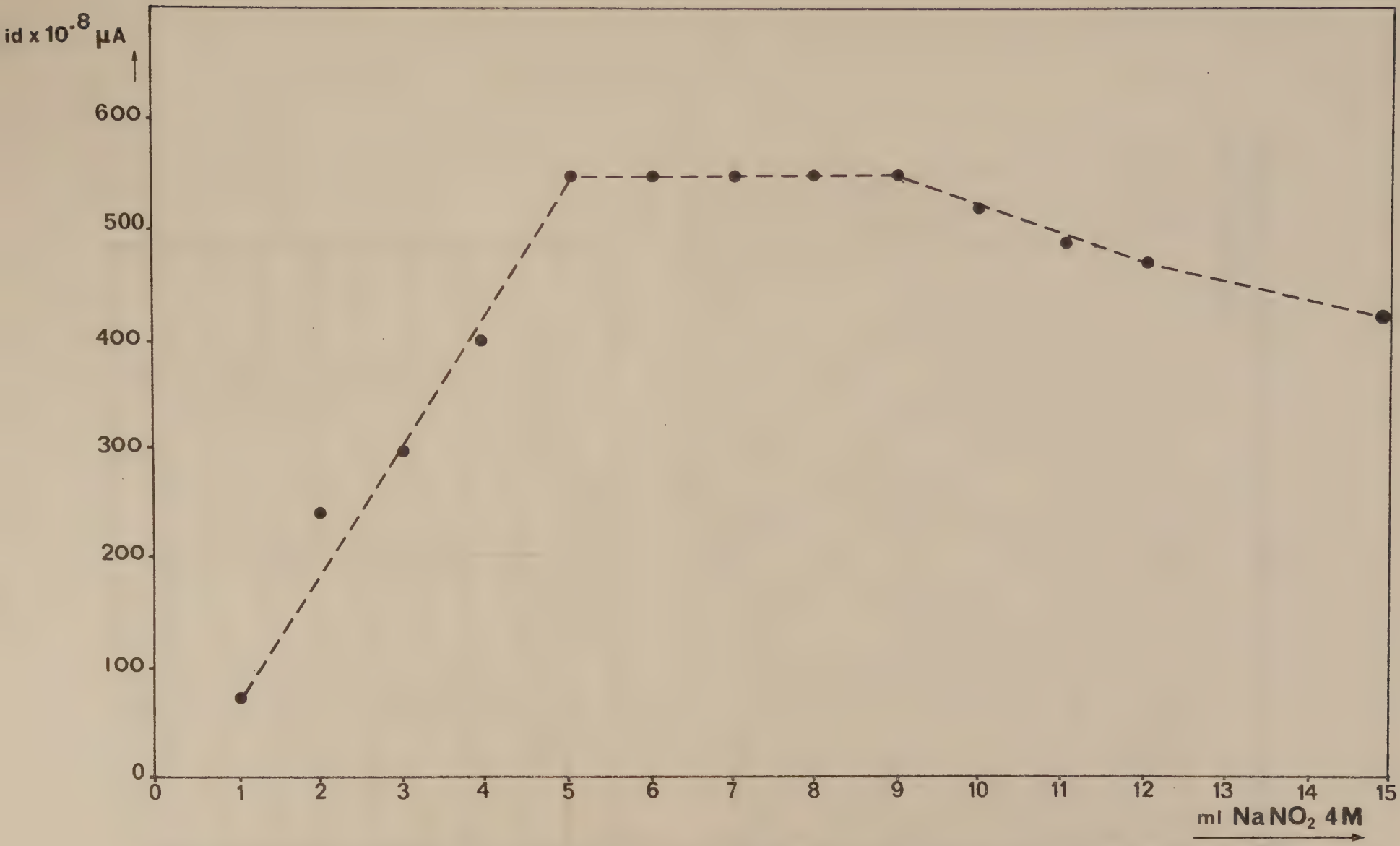


Figure 12

Etude de l'influence de la concentration en nitrite de sodium sur le rendement de la réaction de formation du nitropropionate de sodium à partir de la propiolactone

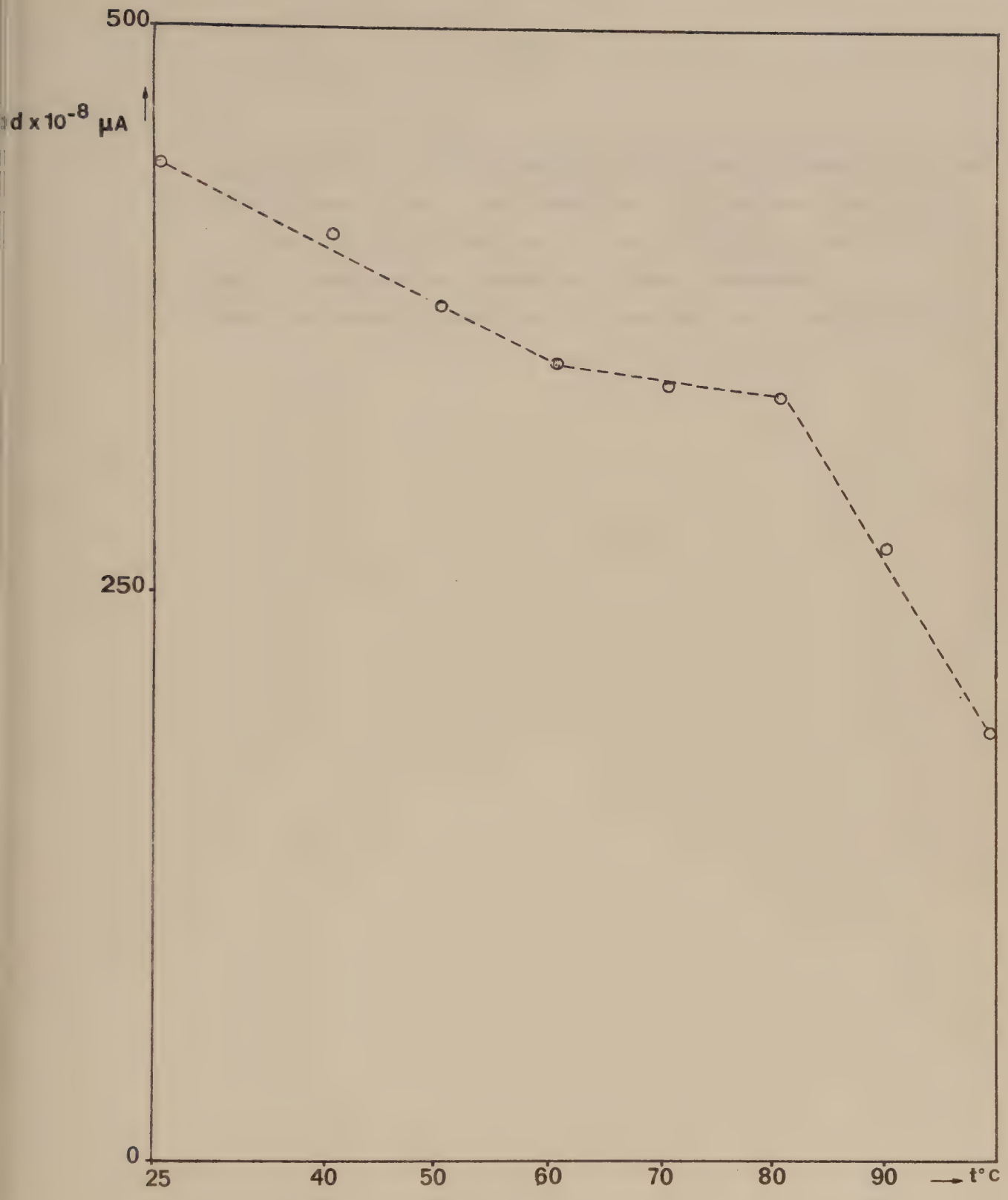
c) Etude de l'influence de la température et de la durée de chauffage :

Une solution contenant 20 millimoles de nitrite de sodium dissous dans le tampon pH 7,5, est additionnée de I ml de propiolactone à Ip.IOOO. Le volume est ajusté à 20 ml et laissé à température ambiante (25º) pendant une durée de 2 minutes à 2 H 30'. On constate (figures 13 et 14 pages 63 et 66), qu'en 30 minutes, à température ambiante, la réaction atteint l'équilibre et que le produit de réaction reste stable pendant encore au moins deux heures. Nous avons vérifié que dans ces conditions également, la propiolactone seule et le nitrite de sodium seul ne sont pas réductibles à l'électrode à goutte de mercure. Par ailleurs, nous avons étudié l'influence de la température sur le rendement de la réaction après I5 minutes à diverses températures.

TABLEAU XIII

Température	i_d x 10^{-8} µA
25º	440
40º	4I0
50º	380
60º	355
70º	345
80º	340
90º	272
I00º	I90

Figure 13



Influence de la température sur le rendement de la réaction de formation du nitropropionate de sodium

La diminution de l'intensité du courant de réduction est probablement due à une réaction d'hydrolyse parallèle à la réaction de nitration qui est d'autant plus intense que la température augmente. Cette hypothèse sera examinée dans l'étude de l'hydrolyse de la propiolactone.

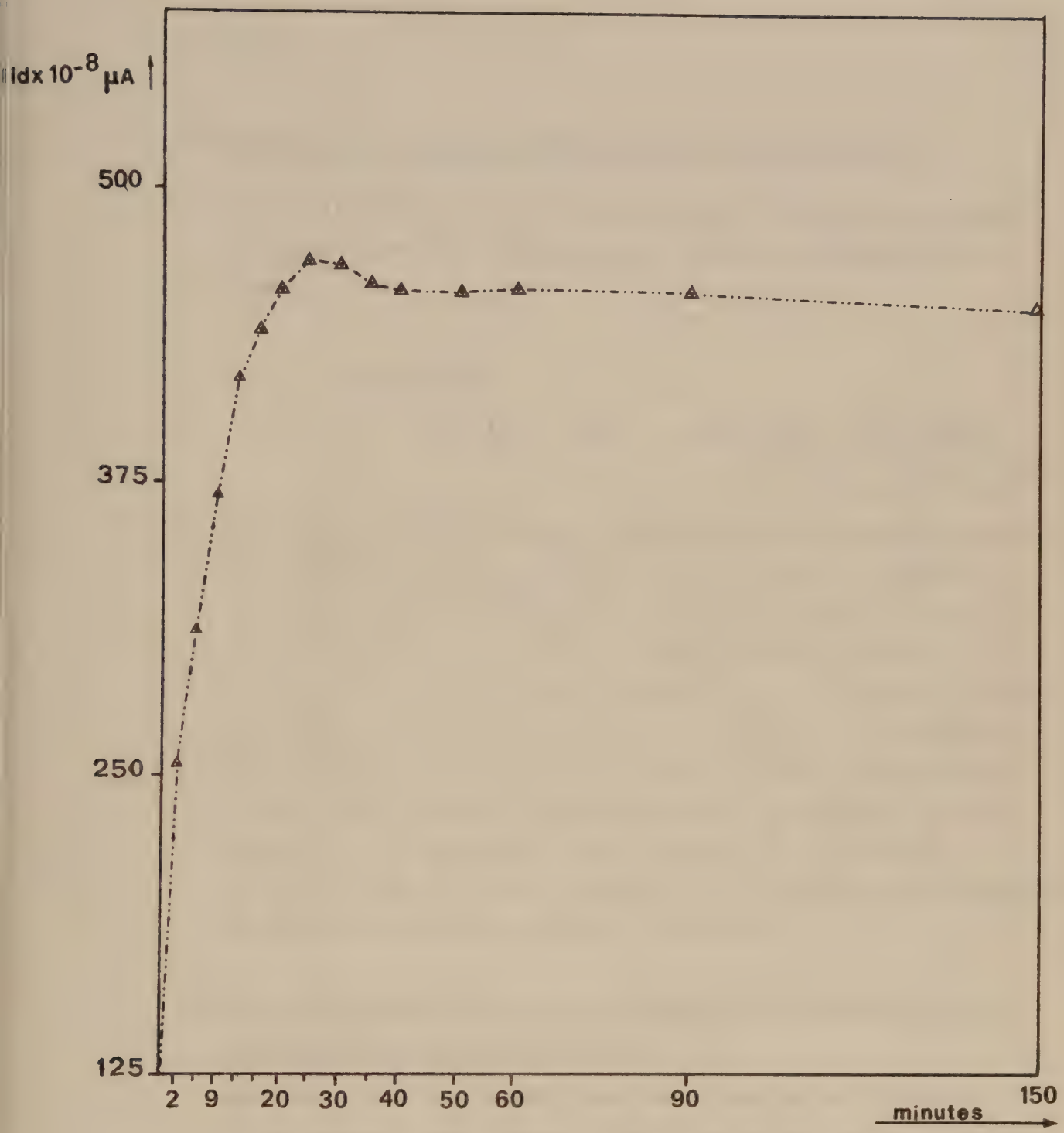
INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT

Conditions opératoires : nitrite de sodium 4 M : 5 ml
pH constant : 7,5
propiolactone I p. I000 I ml
température : 25º

TABLEAU XIV

Temps en minutes	i_d x 10^{-8} µA
2	255
5,30	3II
9	370
I2,30	420
I6	440
20	457
25	470
30	467
35	460
40	457
50	457
60	458
90	457
I50	450

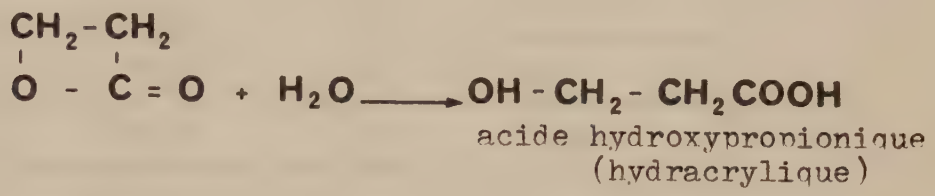
Figure 14



Influence du temps de contact entre la propiolactone et le nitrite de sodium à 25°

d) Etude de l'influence des produits de dégradation :

Par hydrolyse, la propiolactone est susceptible de produire de l'acide hydracrylique selon la réaction suivante :



De plus, les échantillons commerciaux contiennent parfois des traces d'acide acrylique. Nous avons pu vérifier que ni l'acide hydracrylique, ni l'acide acrylique n'interfèrent avec la méthode proposée dans la mesure où le milieu est convenablement tamponné. Il y a lieu de noter que dans les conditions normales d'emploi de la méthode, en supposant que la propiolactone se soit intégralement transformée en acide hydracrylique, la quantité d'acide apportée par la prise d'essai serait de l'ordre de IO à II x IO^{-3} mEq pour une solution de I p.IOOO et la variation du pH de la solution serait négligeable.

e) Etude des variations de l'intensité du courant avec la concentration en propiolactone :

Sans modifier les conditions habituelles de réaction et de mesure, nous avons étudié la variation de l'intensité pour des concentrations finales en propiolactone de 5,7 à 85,9 µg/ml.

TABLEAU XV	
Propiolactone (µg/ml)	intensité (i_d x 2 x IO^{-8} µA)
85,9	295
57,3	I85
34,2	I45
28,5	72,5
II,4	53
5,7	30
0	0

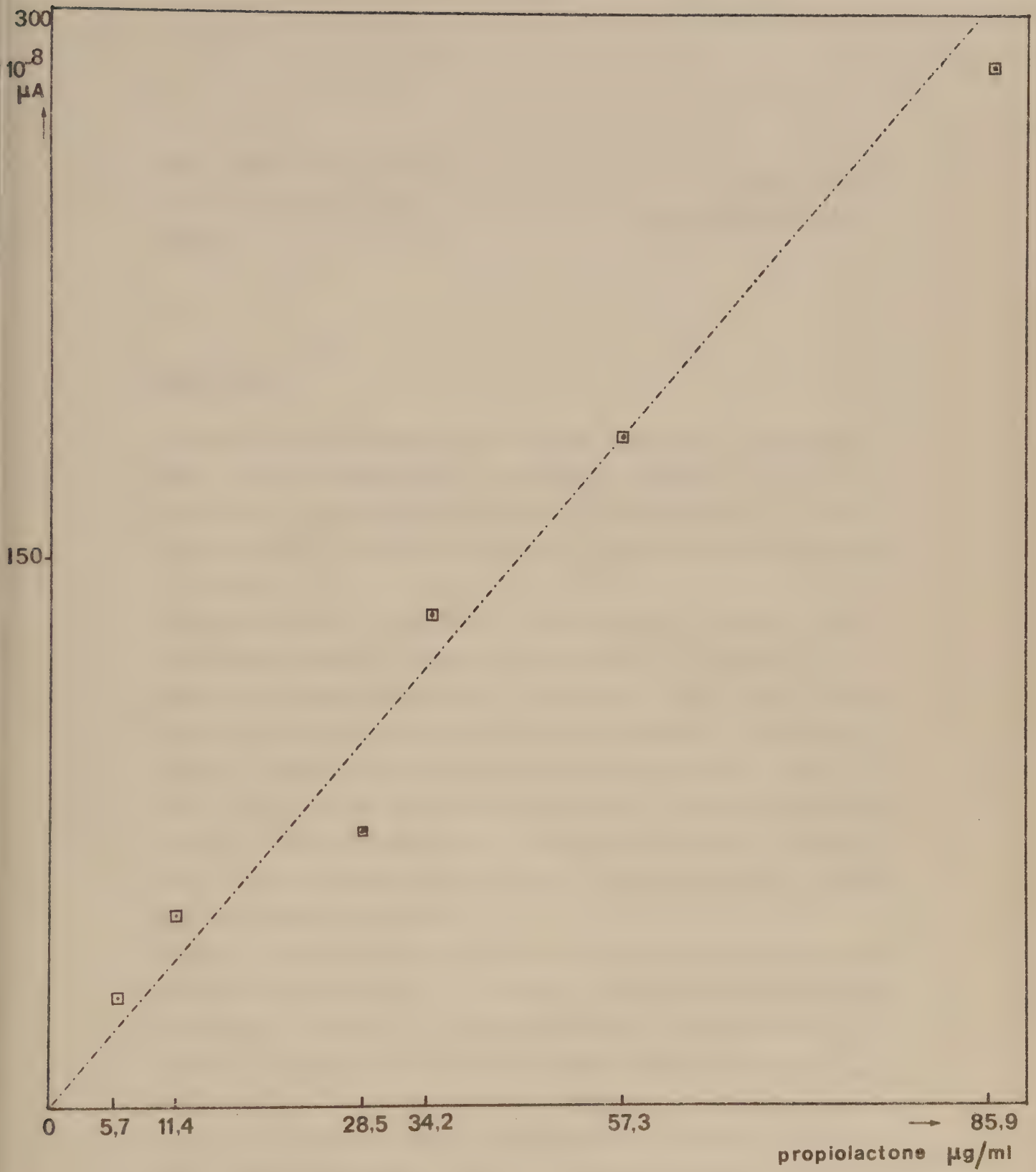
f) Vérification de la spécificité de la méthode :

Le nitropropionate de sodium et le dérivé nitré de la propiolactone présentent les mêmes caractéristiques polarographiques (figure 11 page 57). La comparaison des intensités du courant de réduction permet de constater que le rendement de la réaction est de l'ordre de 80 % et qu'il paraît remarquablement constant (figure 15 page 69).

La vérification statistique de ces résultats réalisée sur calculatrice Hewlett-Packard (type 9 I00 B permet d'établir un coefficient de corrélation de 0,9972, soit pour 4 degrés de liberté un risque $\alpha < 0,0I$ et d'indiquer : A - l'ordonnée à l'origine : - 0,089I

B - la pente = 2,899.

Figure 15



Variation de l'intensité du courant de réduction en fonction de la concentration en propiolactone

Ces résultats mettent en évidence la reproductibilité de la réaction pour les diverses concentrations étudiées,

g) Conclusion :

L'étude de l'influence des divers facteurs intervenant dans le déroulement de la réaction chimique et le comportement polarographique du nitropropionate de sodium formé, nous a permis de dégager les conditions pratiques du dosage.

L'application du procédé à des solutions pures de propiolactone permet l'identification et le dosage de teneurs en propiolactone de l'ordre de IO µg pour I ml de solution. La moyenne des résultats obtenus pour des solutions pures de propiolactone ne varie pas de plus de 3 p. IOO. La limite de détection de la propiolactone en solution est également de l'ordre de IO µg/ml. Cette limite est uniquement fonction de la sensibilité du matériel de mesure utilisé.

De plus, la méthode proposée est simple et n'exige pas d'extraction préalable, elle met en oeuvre des réactifs usuels peu coûteux. La spécificité du procédé est supérieure à la plupart des techniques préconisées pour la recherche de la propiolactone. Enfin, la réaction est complète en 30 minutes à température ambiante et la mesure polarographique, rapide (l'enregistrement nécessite 2 à 3 minutes). La sensibilité et la reproductibilité liées à la stabilité du nitropropionate de sodium se prêtent à des déterminations en série.

CHAPITRE V

A P P L I C A T I O N S

CHAPITRE V

A P P L I C A T I O N S

L'étude précédente nous permet d'envisager l'application de la méthode proposée selon deux directions qui se complètent.
La première consiste en l'étude cinétique de la dégradation de la propiolactone en solution. Des résultats de cette étude peuvent être dégagées des informations utiles quant à son emploi comme agent de stérilisation.
La deuxième direction constitue une application de la méthode au dosage de la propiolactone dans un vaccin.

I. ETUDE DE LA CINETIQUE DE DEGRADATION DE LA PROPIOLACTONE EN SOLUTION AQUEUSE :

Etant donné la commodité de la méthode polarographique et, en particulier, la possibilité de passer des séries d'échantillons (de l'ordre de I5 par heure), nous avons pensé qu'il serait utile de tenter de préciser les mécanismes et la cinétique de dégradation de la propiolactone en solution aqueuse, ce qui nous a également permis de suivre l'évolution du pH au cours de l'hydrolyse.
Nous avons opéré selon la méthode générale proposée (page 54) sur des prises d'essai de I ml de solution de propiolactone à I p. I00 dans l'eau distillée placées à diverses températures.

Nous avons effectué des essais en utilisant deux séries d'échantillons :

- propiolactone de qualité commerciale
- propiolactone pure (redistillée)

Des prises d'essai ont été prélevées à des intervalles qui ont été choisis en fonction de la température de l'essai. L'essai lui-même a été poursuivi dans la mesure du possible, jusqu'à ce que l'on observe au moins 50 % de dégradation. L'étude proprement dite a été menée de la façon suivante :

I. mesure,
2. calcul du pourcentage de propiolactone résiduelle : "C", et des paramètres log. C et I/C (pages 78 à 83) afin de pouvoir déterminer graphiquement l'ordre de la réaction.

En effet, l'évolution de la concentration au cours du temps pour une température déterminée, peut s'exprimer selon l'ordre de la réaction par les équations suivantes :

"0" $C = - k_0 t + C_0$

"I" $\log. C = \frac{- k_I}{\log.10} t + \log. C_0$

"2" $\frac{I}{C} = k_2 t + \frac{I}{C_0}$

C exprime la concentration au temps t,
k_0, k_I, k_2 sont les constantes de vitesse,
C_0 exprime la concentration au temps t_0,
t, la température.

Ayant déterminé l'ordre de la réaction et les constantes de vitesse (qui sont liées à la pente des différentes courbes de dégradation), il est possible d'estimer, d'après la loi d'Arrhénius, la constante de vitesse à diverses températures :

$$\log. k = - \frac{S}{T} + P$$

$$S = \frac{Ea}{R \log. 10}$$

Ea = énergie d'activation
R = constante des gaz parfaits
T = température absolue = t + 273
P = constante qui est fonction des facteurs stériques de la réaction d'hydrolyse.

Nous avons calculé les paramètres des droites de dégradation les plus probables pour les divers ordres de réaction aux températures choisies (page 78 à la page 83). Le calcul des droites de régression, des constantes de vitesse et leur vérification statistique ont été réalisés à l'aide d'une calculatrice HEWLETT PACKARD 9 100 B et des programmes de calcul X - 7 et IV - 10.

Résultats obtenus :

Les résultats font apparaître que la réaction est d'ordre I apparent, dans le cas de la propiolactone de qualité commerciale et ce résultat est en concordance avec les

précédents travaux publiés sur ce sujet. En revanche, l'étude de l'hydrolyse de la propiolactone pure apparaît comme suivant une cinétique d'ordre 0, ce qui indique qu'il n'y a pas que la réaction de solvolyse qui entre en jeu. Et, à cela, s'ajoute le fait qu'au-delà de 50º, on observe une accélération du processus d'hydrolyse qui n'évolue plus de façon linéaire.

On observe (tableau XVI) des différences nettes de stabilité entre la propiolactone pure et la propiolactone de qualité commerciale, qui sont en faveur de cette dernière et en concordance avec les propres observations de Schonwalder (97).

TABLEAU XVI

Propiolactone commerciale		Propiolactone distillée	
Ordre 0	Série I	Ordre 0	Série 2
k 25º	0,3303	k 20º	0,I8I4
k 50º	0,8698	k 45º	0,822
Ordre I k 25º	0,000916	Ordre I k 20º	0,00047
k 50º	0,0060I	k 45º	0,0608
Ordre 2 k 25º	0,000076	Ordre 2 k 20º	0,00004
k 50º	0,00279	k 45º	0,00348

Par ailleurs, la mesure de l'évolution du pH de la solution aqueuse (tableau XVII) paraît confirmer cette observation et permet de formuler l'hypothèse que l'acide hydracrylique formé a tendance à s'inter estérifier et par là même à stabiliser le pH.

Il convient donc de noter que la dégradation de la propiolactone constitue un ensemble de phénomènes complexes et que ces résultats ne sauraient être extrapolés à l'étude de l'hydrolyse dans des milieux biologiques complexes.

VARIATION DU pH D'UNE SOLUTION AQUEUSE DE PROPIOLACTONE
à 4 p. I 000

TABLEAU XVII	
Temps	pH
0 (en absence de propiolactone)	5,9
Ajout de propiolactone	3,9
30"	3,9
60"	3,85
90"	3,80
2'	3,8
3'	3,77
4'	3,75
5'	3,72
6'	3,70
7'	3,69
8'	3,67
9'	3,65
I0'	3,65
I5'	3,60
20'	3,50
25'	3,47
I05'	3,20
II5'	3,20
I20'	3,20

PROPIOLACTONE DE QUALITE COMMERCIALE ORDRE 0

RESULTATS t	20°C	t	45°C	t	60°C
0	100 %	0	100 %	0	100 %
30'	87,5%	10'	75 %	10'	43 %
120'	74,5%	60'	15,8 %	60'	5,6 %
180'	72,0%	90'	6,2 %	-	-
240'	49,5%	120'	2,0 %	-	-
Vérification statistique :					
. coefficient de corrélation	0,964	-	0,9477	-	0,915
. nombre de mesures	5	-	5	-	3
. nombre de degrés de liberté	3	-	3	-	1
. risque α	$< 0,01$	-	$\leq 0,02$	-	$> 0,1$
Ordonnée à l'origine	97,37	-	85,834	-	80,03
Pente	- 0,1814	-	- 0,8220	-	- 1,3071
Constante de vitesse	0,1814	-	0,8220	-	1,3071
Ecart type/pente	- 3,39	-	- 7,07	-	- 18,09
Ecart type/origine	6,9	-	4,9	-	3,29

...

PROPIOLACTONE DE QUALITE COMMERCIALE ORDRE 1

RESULTATS t	20°C	t	45°C	t	60°C
0	2	0	2	0	2
30'	1,942	10'	1,875	10'	1,633
120'	1,872	60'	1,198	60'	0,748
180'	1,857	90'	0,792	-	-
240'	1,694	120'	0,301	-	-
Vérification statistique : . Coefficient de corrélation	0,94776	-	0,99921	-	0,99118
. nombre de mesures	5	-	5	-	3
. nombre de degrés de liberté	3	-	3	-	1
. risque α	$\leq$ 0,05	-	$<$0,01	-	$<$0,01
Ordonnée origine	1,99709	-	2,01713	-	1,92339
Pente	- 0,00109	-	-0,0140	-	- 0,01985
Constante de vitesse	0,00047	-	0,00608	-	0,0862
Ecart type/pente	-5,1469	-	-43,590	-	-77,477
Ecart type/ordonnée origine	65,060	-	86,771	-	20,636

...

PROPIOLACTONE DE QUALITE COMMERCIALE

ORDRE 2

RESULTATS t	20°C	t	45°C	t	60°C
0	0,01	0	0,01	0	0,01
30	0,0114	10	0,0133	10	0,0232
120	0,0134	60	0,0632	60	0,1785
180	0,0138	90	0,01612	-	-
240	0,0202	120	0,5	-	-
Vérification statistique :					
. coefficient de corrélation	0,9151	-	0,86854	-	0,9963
. nombre de mesures	5	-	5	-	3
. nombre de degrés de liberté	3	-	3	-	1
. risque α	$> 0,02$	-	$\simeq 0,05$	-	$< 0,01$
Ordonnée à l'origine	0,0096	-	0,045	-	0,0028
Pente	0,00004	-	0,00348	-	0,0029
Constante de vitesse	0,00004	-	0,00348	-	0,0029
Ecart type/pente	3,9307	-	3,0353	-	11,642
Ecart type/ordonnée origine	7,3566	-	0,544	-	0,3194

...

PROPIOLACTONE REDISTILLEE ORDRE 0

RESULTATS t	4° - C	t	25° C	t	50° - C
0	100 %	0	100 %	0	100 %
90'	80,6%	90'	70,16%	10'	92,7 %
120'	62,9%	120'	52,4%	20'	77,4 %
	-	180'	42,7%	30'	72,58%
	-	-	-	40'	64,5 %
	-	-	-	90'	7,86%
	-	-	-	120'	2,66%
Vérification statistique : . coefficient de corrélation	0,99996	-	0,98428	-	0,98626
. nombre de mesures	3	-	4	-	7
. nombre de degrés de liberté	1	-	2	-	5
. risque α	$<0,01$	-	$>0,01$	-	$\ll 0,01$
Ordonnée à l'origine	99,71	-	98,52	-	98,19
Pente	-0,20611	-	-0,3303	-	-0,8698
Constante de vitesse	0,20611	-	0,3303	-	0,8698
Ecart type/pente	-3,8427	-	-7,8803	-	-13,347
Ecart type/ ordonnée	15,630	-	20,0615	-	24,965

...

PROPIOLACTONE REDISTILLEE

ORDRE 1

RESULTATS t	4°C	t	25°C	t	50°C
0	2,0	0	2,0	0	2,0
90'	1,9063	90'	1,84609	10'	1,96708
120'	1,7986	120'	1,71933	20'	1,88874
	-	180'	1,6304	30'	1,8608
	-	-	-	40'	1,8095
	-	-	-	90'	0,8954
	-	-	-	120'	0,4248
Vérification statistique : . coefficient de corrélation	0,94884	-	0,98656	-	0,98084
. nombre de mesures	3	-	4	-	7
. nombre de degrés de liberté	1	-	2	-	5
. risque α	$> 0,1$	-	$> 0,02$	-	$< 0,01$
Ordonnée à l'origine	2,008	-	2,004	-	2,1631
Pente	- 0,00153	-	- 0,00211	-	- 0,01385
Constante de vitesse	0,000664	-	0,000916	-	0,00601
Ecart type/pente	- 3,006	-	- 8,5388	-	- 11,2590
Ecart type/ordonnée origine	45,535	-	69,167	-	29,119

...

PROPIOLACTONE REDISTILLEE — ORDRE 2

RESULTATS t	4°C	t	25°C	t	50°C
0	0,0100	0	0,0100	0	0,0100
90'	0,01241	90'	0,01425	10'	0,01079
120'	0,01590	120'	0,01908	20'	0,01292
	-	180'	0,02342	30'	0,01378
	-	-	-	40'	0,01550
	-	-	-	90'	0,12723
	-	-	-	120'	0,37594
Vérification statistique : . coefficient de corrélation	0,9263	-	0,97668	-	0,9036
. nombre de mesures	3	-	4	-	7
. nombre de degrés de liberté	1	-	2	-	5
. risque α	$> 0,1$	-	$> 0,02$	-	$< 0,01$
Ordonnée à l'origine	0,00969	-	0,009294	-	0,042
Pente	0,000044	-	0,000076	-	0,00279
Constante de vitesse	0,000044	-	0,000076	-	0,00279
Ecart type/pente	2,4583	-	6,4332	-	4,7180
Ecart type/ordonnée origine	6,25161	-	6,7308	-	1,1990

2. APPLICATION A L'ETUDE D'UN VACCIN ANTIRABIQUE :

Nous avons appliqué notre méthode à la recherche de traces de propiolactone dans un vaccin antirabique au cours de son inactivation*.

- Mode opératoire :

Le principe de la préparation du vaccin antirabique a été indiqué page 19 . Pour notre part, nous avons prélevé la suspension de matière cérébrale dès la fin de l'opération d'addition de la propiolactone. Le prélèvement a été ensuite conservé à + 4º C pendant 48 heures. Lors de la mesure, le prélèvement de IO ml a été additionné de 500 mg de nitrite de sodium puis porté IO minutes au bain-marie bouillant, refroidi et polarographié sans filtration ni centrifugation. Nous avons pu constater la présence de quantités importantes de propiolactone (IO %) non hydrolysée après 48 heures de contact avec la suspension virulente à + 4º C.

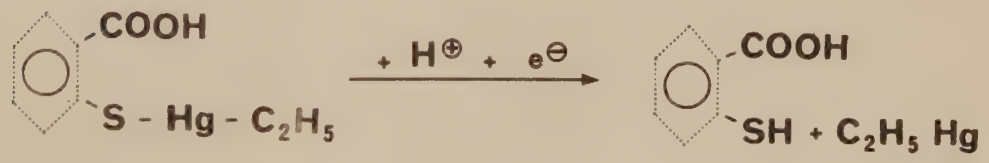
*Nous tenons à cette occasion, à manifester notre reconnaissance à l'Institut Pasteur d'Algérie en la personne de son directeur, le Docteur R. NEEL et du chef du Service de la Rage : le Docteur M. RIBEIRO, qui a bien voulu nous fournir les échantillons examinés.
Que soit ici remercié Monsieur le Professeur M. SALHI de la Faculté de Médecine et Pharmacie d'Alger qui a bien voulu mettre son laboratoire à notre disposition.

L'observation de la dégradation à température ambiante montre que la teneur en propiolactone résiduelle diminue de 50 % en 50 minutes. Ceci peut difficilement être extrapolé, compte tenu de la complexité du milieu réactionnel. Il n'en demeure pas moins que l'hydrolyse paraît être relativement lente. Nous pensons qu'il est souhaitable d'attirer l'attention sur deux faits :

. il est indispensable d'utiliser une propiolactone de bonne qualité, si possible récemment redistillée sous pression réduite et en tous cas d'en vérifier le titre.

. l'hydrolyse n'est pas immédiate et l'utilisateur devrait s'assurer de l'absence de traces notables de propiolactone dans le produit terminé.

Il faut signaler d'autre part, que les préparations de ce type renferment en outre des antiseptiques tels que le Merthiolate. Ce composé est réductible à l'électrode à goutte de mercure selon le schéma suivant (7) :



Nous avons vérifié le comportement polarographique du Merthiolate en tampon pH 7,5, puis en milieu pH 7,5 contenant du nitrite de sodium et en présence de propiolactone. Que l'on soit en milieu tampon pH 7,5 seul ou en présence de nitrite de sodium, on observe une vague de

réduction de potentiel de demi-vague =-0,775 V et dont l'intensité est assez faible (une solution à 6,2 mg pour 100 ml donne un courant de réduction de 20×10^{-8} µA). Compte tenu de la quantité de merthiolate utilisée dans le vaccin antirabique, l'interférence éventuelle (car son potentiel de réduction est assez différent de celui du nitropropionate de sodium) est négligeable.

TROISIEME PARTIE

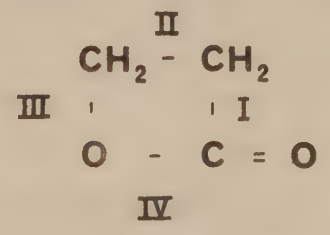
COLORIMETRIE DE LA PROPIOLACTONE

TROISIEME PARTIE

COLORIMETRIE DE LA PROPIOLACTONE

CHAPITRE VI : REACTIONS DIVERSES

De nombreuses méthodes colorimétriques ont été décrites pour la recherche de traces de propiolactone. Elles mettent en jeu diverses réactions et notamment celles de la fonction lactone et les propriétés alkylantes de la propiolactone. Nous avons repris l'étude de certaines méthodes et, compte tenu des observations effectuées, tenté d'utiliser d'autres réactifs susceptibles d'améliorer la simplicité, la spécificité et la sensibilité des techniques proposées. Il faut souligner ici l'analogie des propriétés de la propiolactone avec celles de l'oxyde d'éthylène et du formaldéhyde et rappeler que, si le processus de synthèse met en jeu le cétène et le formaldéhyde, dans certaines conditions, la molécule peut subir une scission II - IV, comme l'ont montré les études par spectrographie de masse (24).



I. REACTION DU 2,7-DIHYDROXYNAPHTALENE :

Nous avons appliqué la réaction de diverses lactones avec le 2,7-dihydroxynaphtalène dans l'acide sulfurique concentré.

Dans le cas particulier de la propiolactone, il apparaît une coloration rose qui passe au rouge intense par chauffage. Le mécanisme de cette réaction est comparable à celui de la réaction du formaldéhyde sur l'acide 6-amino I-naphtol 3-sulfonique qui est utilisé pour son dosage. Les essais préliminaires s'étant avérés encourageants, nous avons précisé les conditions opératoires de cette réaction appliquée à la propiolactone.

Partie expérimentale :

La réaction est sensible : IO µg/ml de propiolactone permettent d'obtenir une densité optique voisine de 0,3. Nous avons vérifié que l'intensité de la coloration suit la loi de Beer-Lambert pour des concentrations comprises entre IO et I00 µg de propiolactone. Le maximum d'absorption du composé coloré est bien défini : 540 $\pm$ 2 nm. Les produits de dégradation n'interfèrent pas ; l'intensité de la coloration obtenue est stable au moins 60 minutes.

- réactifs :

. 2,7-dihydroxynaphtalène..... 0,I6 g
. acide sulfurique concentré q. s. p..... I ml

Ce réactif est peu stable et doit être préparé extemporanément.

- mode opératoire :

A une prise d'essai contenant environ IO µg de propiolactone dans l'eau distillée, ajouter I ml de réactif avec précaution, adapter un réfrigérant à reflux et porter I5 minutes au bain-marie bouillant. Laisser refroidir puis ajuster à 5 ml à l'aide d'acide sulfurique concentré. Lire à 540 nm en utilisant comme témoin une solution sans propiolactone.

- résultats :

. Le traitement à l'ébullition ne présente pas de difficulté particulière, hormis le risque d'une perte en propiolactone par volatilisation.

. La spécificité de la méthode n'est pas très élevée, compte tenu du fait que de nombreuses substances, traitées par l'acide sulfurique concentré peuvent interférer. Cette méthode rapide et facile à mettre en oeuvre moyennant des précautions élémentaires paraît intéressante pour le dosage de la propiolactone pure. Elle ne saurait à elle seule constituer une méthode d'identification absolue.

2. Réaction avec l'hydroxylamine :

Cette réaction, décrite par HOFFMAN et WARSHOWSKY (52) est basée sur la formation d'un hydroxamate dont le chelate ferrique est intensément coloré.

Cette technique, très sensible, n'est pas spécifique et dans le cas particulier de la propiolactone, risque d'en accélérer la dégradation car une distillation préalable est nécessaire.

3. Réaction colorée avec la pyridine :

Cette réaction est préconisée par SNELL (I02) pour la détection de l'oxyde d'éthylène. Nous avons tenté d'appliquer cette réaction à la propiolactone. Le produit de la réaction est effectivement coloré en brun jaunâtre, mais l'intensité observée est trop faible pour une méthode de recherche de traces.

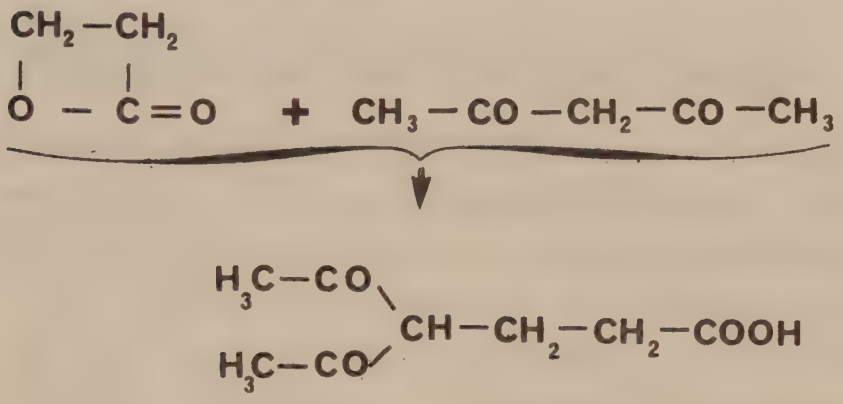
4. Réaction à l'acide chromotropique :

Un certain nombre de méthodes de dosage des époxydes repose sur le principe de l'oxydation par l'acide periodique de l'échantillon et coloration sous l'action de l'acide chromotropique (8.I0.I3.78). Nous avons constaté que l'application de cette réaction au dosage de la propiolactone en solution dans l'acide sulfurique concentré provoque l'apparition d'une coloration violette extractible par le chloroforme. Cependant, la sensibilité en est insuffisante pour une recherche de traces.

5. Réaction de HANTZSH (formation d'une lutidine) (8I) :

Cette réaction qui consiste à faire réagir le formaldéhyde avec une amine primaire en présence d'acétylacétone

n'est pas directement utilisable car la propiolactone réagit en donnant l'acide 4-acétyl 5-oxo hexanoïque selon le schéma suivant :



Cependant, nous avons pu obtenir des colorations jaune-verdâtre relativement intenses en faisant agir successivement sur l'échantillon examiné :

- un excès d'acide periodique pendant IO minutes, puis
- un excès d'anhydride arsénieux pour éliminer l'excès d'oxydant,

puis en ajoutant le réactif suivant :

. acétate d'ammonium.R.P.....	I50 mg
. acide acétique.R.P.....	3 ml
. acétylacétone.R.P.....	2 ml

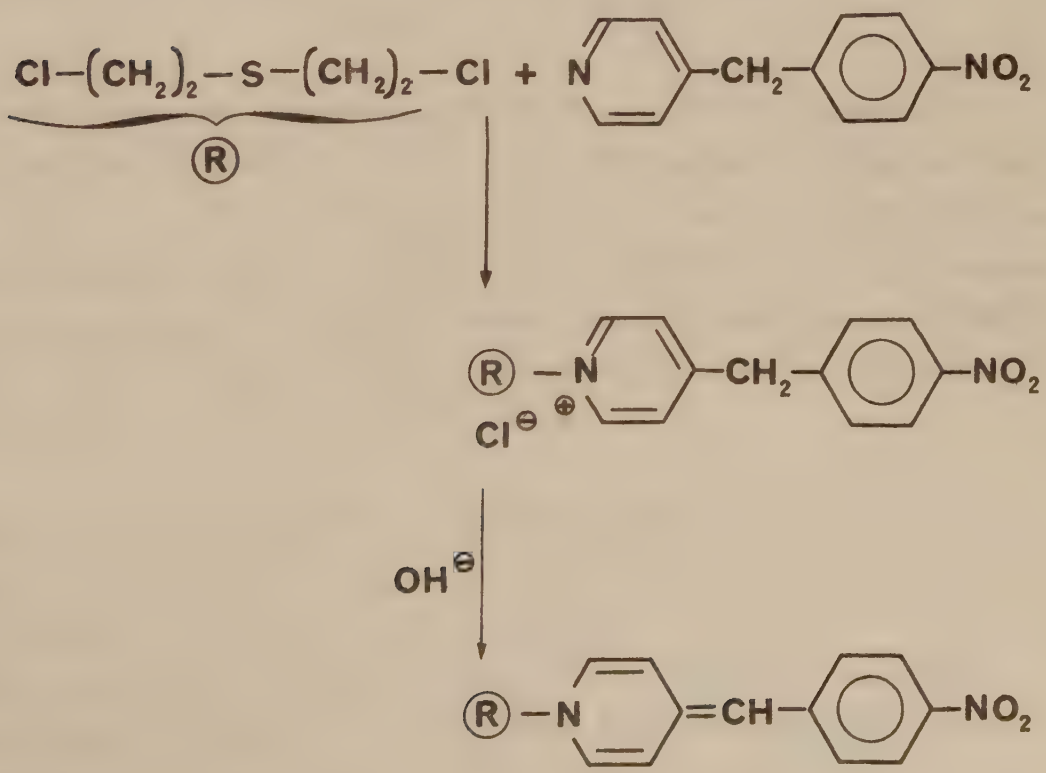
L'échantillon et le réactif, soigneusement homogénéisés, sont maintenus 5 minutes à 50º. Après refroidissement, lire à 4I2 nm. On constate une absorption nette, mais insuffisante pour un dosage sensible.
Selon nous, la dilution (par les réactifs) due au traitement préliminaire, qui est défavorable, et la spécificité que l'on peut attendre de la méthode ne justifient pas une étude approfondie des modalités de la réaction d'oxydation periodique.

CHAPITRE VII

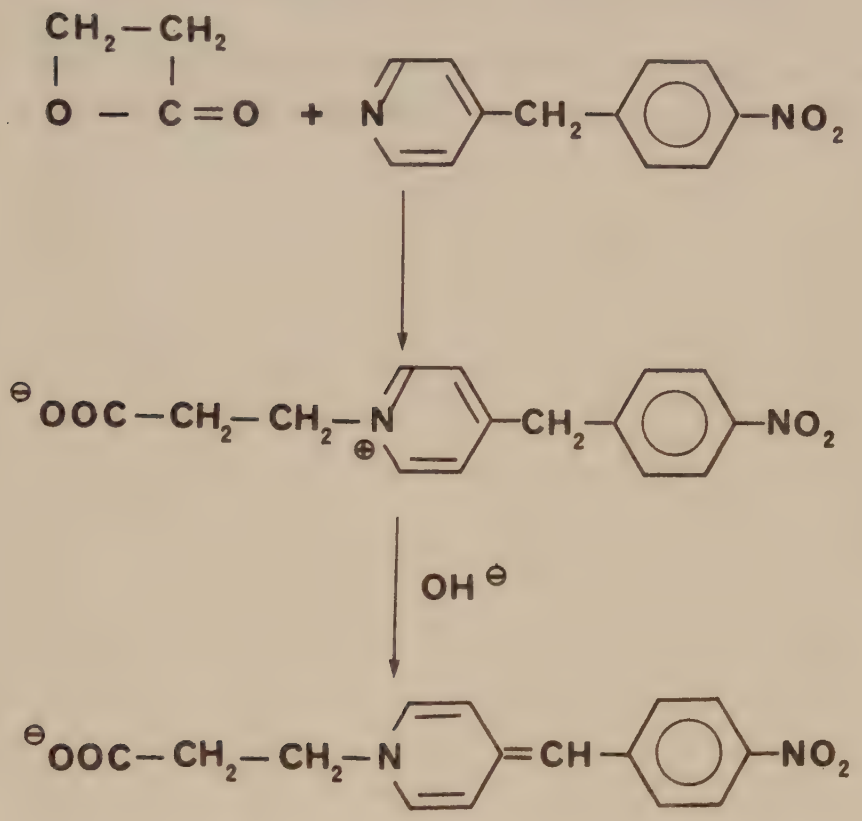
APPLICATION DE REACTIONS D'ALKYLATION A LA COLORIMETRIE DE LA PROPIOLACTONE :

I. Réaction avec la 4-4'-nitrobenzylpyridine :

KOENIGS, KOHLER et BLINDOW (60) ont décrit les réactions de la γ-(4-nitrobenzylpyridine) (NBP), de la 2-benzylpyridine et de la 4-benzylpyridine avec l'iodure de méthyle. Le produit de la réaction avec la γ-(4-nitrobenzylpyridine) donne par alcalinisation un colorant bleu, selon un mécanisme réactionnel particulier. Le mécanisme a été étudié en particulier par HOLZMAN (53), qui a pu identifier les intermédiaires de réaction entre le 2-2' dichloro-diéthylsulfure (gaz moutarde) et la NBP.



Dans le cas de la propiolactone, le mécanisme suivant peut être proposé :



Cette réaction a été ensuite appliquée à la détection du gaz moutarde (60) puis de divers agents d'alkylation (I7) (66) et à l'évaluation de leur activité(23). Enfin, R. TRUHAUT (II4bis), EPSTEIN (I8), SAWICKI (96) proposèrent des techniques de dosage basées sur la réaction de KOENIGS. Une première application à l'estimation de la propiolactone fût décrite par FAYET (I9).

Récemment, un procédé de chromatographie sur plaque utisant la NBP comme réactif de révélation de divers agents d'alkylation, dont la propiolactone a été décrit (83). Pour notre part, nous avons mis en oeuvre les diverses techniques proposées et constaté qu'il convenait d'apporter des précisions sur les conditions opératoires.

- Dosage colorimétrique des agents alkylants :

Les techniques proposées pour l'estimation des agents alkylants sont résumées dans le tableau XXIV.

METHODES COLORIMETRIQUES UTILISANT LA 4-4' NITROBENZYLPYRIDINE

TABLEAU XXIV

AUTEUR	EPSTEIN (I8)	EPSTEIN (I8)	SAWICKI (96)	TRUHAUT (II4bis)	FAYET (I9)	TECHNIQUE PROPOSEE
Solvant de la prise d'essai	Tampon pH 4 (CLARK et LUBS)	Méthyléthyl-cétone	acétophénone	Tampon acéto-acétique pH4,8 0,I M	eau	alcool ou acétophénone
Concentration du réactif	5 %	5 %	50 %	5 %	0,05 M	0,05 M
Solvant du réactif	Méthyléthylcétone ou acétophénone		acétophénone	Méthyléthyl-cétone	eau / alcool } aa	
Chauffage	20' à I00º	45' à l'ébullition	35' à I80º	I5' à 80º	30' à 60º	30' à 80º
Refroidissement	B A I N D E G L A C E					
Ajustage au volume par :	acétone	acétone	-	-	éthanol	eau + alcool
Révélation	carbonate de potassium	Triéthylamine	cyclo-hexylamine	triéthylamine 50%/acétone	Na OH 0,I N	Na OH 0,I N
Lecture	600 nm	565 nm	565/568 nm	565 nm	570 nm	570 nm
Stabilité	aucune	2'	-	2'	30'	30' (maximum)

Le principe général demeure inchangé, les techniques différant entre elles par le solvant, la température, le pH et la durée de la réaction. Nous avons repris l'étude expérimentale de ces techniques, il nous est apparu que la méthode de EPSTEIN ne se prête pas au dosage de la propiolactone. En revanche, celle de FAYET permet d'obtenir une coloration bleu-violet dont l'intensité est mesurée à 570 nm. Nous avons repris cette méthode en vue de préciser les conditions opératoires et de délimiter son champ d'application.

PARTIE EXPERIMENTALE :

- réactifs : - 4,4'-nitrobenzylpyridine : 0,05 M dans un mélange eau + éthanol (50 : 50)
  - méthyléthylcétone pure
  - acétophénone ou éthanol
  - propiolactone redistillée

- mode opératoire :

A une prise d'essai renfermant la propiolactone, ajouter de l'acétophénone ou de l'éthanol de telle sorte que l'on obtienne une concentration voisine de 500 µg/ml. Prélever 2 ml de cette dilution, ajouter 2 ml de réactif 4 - 4'nitrobenzylpyridine dans eau + éthanol à parties égales). Porter le mélange pendant 30 minutes au bain-marie à 80º. Refroidir. Alcaliniser par 0,5 ml de Na OH 0,I N. Amener à un volume final de 20 ml à l'aide du mélange eau + éthanol. Lire à 570 nm contre un témoin à blanc des réactifs. A l'aide de dilutions de propiolactone pure, établir un étalonnage.

- Etude des conditions opératoires :

. Etude de l'influence du pH avant lecture :

Nous avons appliqué la technique décrite en alcalinisant le milieu réactionnel au moment de la lecture. Les résultats obtenus à partir d'une solution renfermant avant lecture 25,5 µg/ml (tableau XXV), montrent que l'influence du pH est particulièrement sensible sur le déroulement de la réaction car 0,9 unité pH provoquent une variation de densité optique de 0,085.
De plus, après 60 minutes, la densité optique diminue notablement quel que soit le pH du milieu réactionnel.

TABLEAU XXV

NaOH 0,1 N ajoutée	pH	Do à t = 0	D_1 à t_0+15'	ΔDo	D_2 à t_0+60'	ΔDo
0,1 ml	12,0	0,255	0,240	0,015	0,190	0,065
0,2 ml	12,5	0,285	0,260	0,025	0,180	0,105
0,5 ml	12,7	0,315	0,280	0,035	0,180	0,135
1 ml	12,9	0,340	0,300	0,040	0,185	0,255

. Etude de l'influence de la température :

Nous avons appliqué la technique décrite en modifiant seulement la température et la durée de séjour au bain-marie. Les résultats obtenus à 65º (tableau XXVI) et à 80º (tableau XXVII) montrent que la durée du chauffage et son intensité modifient l'intensité de la coloration. La durée du chauffage ne semble pas avoir d'incidence sur

la stabilité de la coloration pendant une heure.

Température : 65º

TABLEAU XXVI			
Temps de chauffage	Do au temps t_0	Do au temps : t_0 + I5'	Δ Do
5'	0,2I0	0,I70	0,05
I0'	0,293	0,248	0,045
I5'	-	0,245	-
30'	0,458	0,4I8	0,040

Température : 80º

TABLEAU XXVII	
Temps de chauffage	Do
5'	0,360
I0'	0,472
I5'	0,520
30'	0,523

A la température de 80º, un temps de contact de I5 minutes permet d'atteindre une densité optique maximum, ce qui est en accord avec les observations de R. TRUHAUT (II4 bis).

- Etude de l'influence de la concentration en réactif :

Nous avons également appliqué la technique en modifiant les concentrations en réactif. Les résultats (tableau XXVIII) montrent qu'une durée de chauffage de 30 minutes à 80º avec une concentration en propiolactone et réactif respectivement 0,694 x 10^{-3} mM et 0,10 mM permet d'obtenir une solution stable pendant au moins 30 minutes et présentant une densité optique maximum.

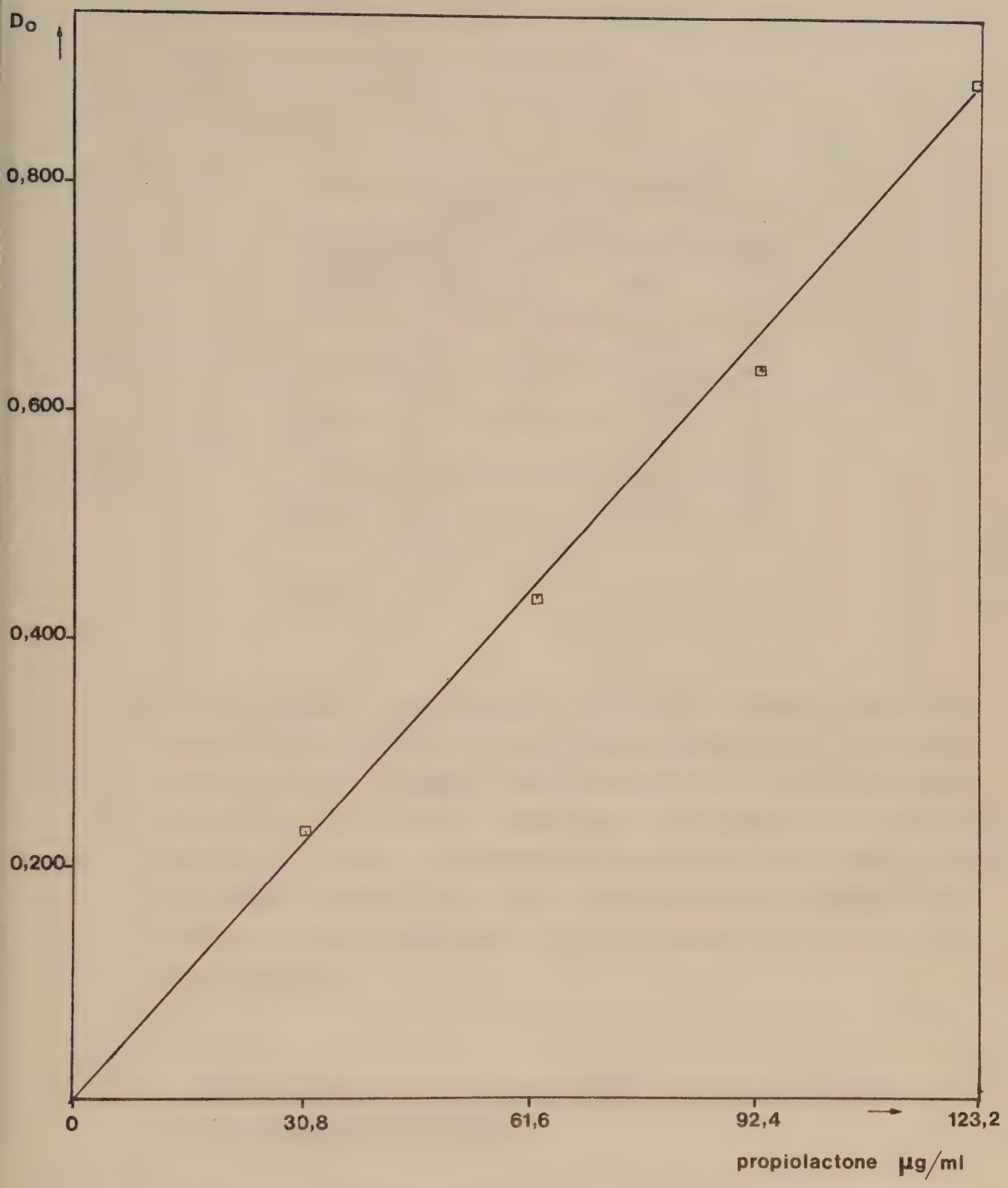
TABLEAU XXVIII

Temps à 80º	réactif	Do au temps t_0	D_1 au temps : t_0+ 15'	D_2 au temps : t_0 + 30'	D_3 au temps : t_0 + 60'
20'	2 ml	0,424	0,424	0,420	0,412
20'	3 ml	0,388	0,387	0,383	-
30'	2 ml	0,458	0,453	0,450	0,440
30'	3 ml	0,452	0,450	0,437	-

- Vérification de la loi de BEER-LAMBERT :

Enfin, nous avons appliqué le procédé à des solutions renfermant des concentrations variées en propiolactone. Les résultats obtenus (tableau XXIX) indiquent que l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration entre 30 et 120 µg/ml.

Figure 16



Colorimétrie de la propiolactone par la 4-4'nitrobenzylpyridine : variation de la densité optique en fonction de la concentration en propiolactone

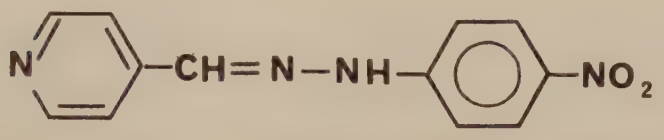
TABLEAU XXIX	
Concentration finale (µg/ml)	Do
30,8	0,230
6I,6	0,438
92,4	0,642
I23,2	0,895

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus nous a permis de démontrer qu'en milieu hydro-alcoolique, la validité de la méthode dépend rigoureusement des conditions opératoires : pH, temps de chauffage, concentration en réactifs. Toutefois, malgré l'amélioration des conditions opératoires, le procédé demeure d'un emploi délicat et ne présente pas une sensibilité suffisante pour la recherche des traces de propiolactone.

2. Réaction colorée avec la 4-pyridine-carboxaldéhyde -4 nitrophénylhydrazone :

Les travaux d'EPSTEIN (I8) sur la 4-4' nitrobenzyl-pyridine ont été complétés en I963 par les recherches de SAWICKI (96) qui a proposé de nouveaux réactifs plus sensibles agissant selon un mécanisme analogue à celui de la NBP et aboutissant à des composés colorés.

Il nous est apparu intéressant d'étudier les possibilités d'application de ces réactifs à la propiolactone. Nous avons retenu la 4-pyridine-carboxaldéhyde 4-nitrophénylhydrazone qui est d'un accès relativement commode :



Après l'avoir synthétisée et contrôlé sa pureté, nous avons étudié ses modalités d'emploi pour la recherche de la propiolactone.

PARTIE EXPERIMENTALE :

a) Synthèse du réactif :

Nous avons utilisé un procédé un peu différent du procédé préconisé par SAWICKI (96). A 25 ml d'une solution méthanolique de 6,32 g (0,059 mole) d'aldéhyde isonicotinique, nous avons ajouté 9,05 g (0,059 mole) de paranitrophénylhydrazine dans le méthanol bouillant et deux gouttes d'acide chlorhydrique concentré comme catalyseur. Le mélange a été laissé au repos pendant une heure à la température du laboratoire. Le volumineux précipité brun a été recueilli par filtration sur verre fritté. Les

"eaux mères" additionnées d'un volume égal d'eau distillée laissent un abondant précipité jaune, amorphe. Les précipités ont été recristallisés dans l'o-dichlorobenzène, puis dans le 2-méthoxyéthanol.

b) Contrôle d'identité :

Le précipité brun brut présente un intervalle de fusion de 269 à 272º C, le précipité jaune brut, un intervalle de 26I à 266º C. Après recristallisation, les deux composés présentent un intervalle de fusion respectivement de 270 à 272º C et 268 à 27Iº C et un spectre infra-rouge identique.

c) Dosage colorimétrique :

. Réactifs : . solution saturée (à I,5 %) dans l'acétophénone
. acétophénone
. cyclohexylamine
. solution de cyclohexylamine à 4 % (V.V) dans l'acétophénone.

. Mode opératoire :

Diluer le cas échéant la prise d'essai à l'aide d'acétophénone, de telle sorte que l'on obtienne une solution contenant environ 30 à 40 µg/ml. Prélever I ml de cette solution, ajouter I ml de réactif, maintenir 60 minutes à IOOº. Refroidir puis ajouter 4 ml de solution de cy-

clohexylamine à 4 %. Lire la densité optique à 633 nm contre un témoin sans propiolactone.

RESULTATS OBTENUS :

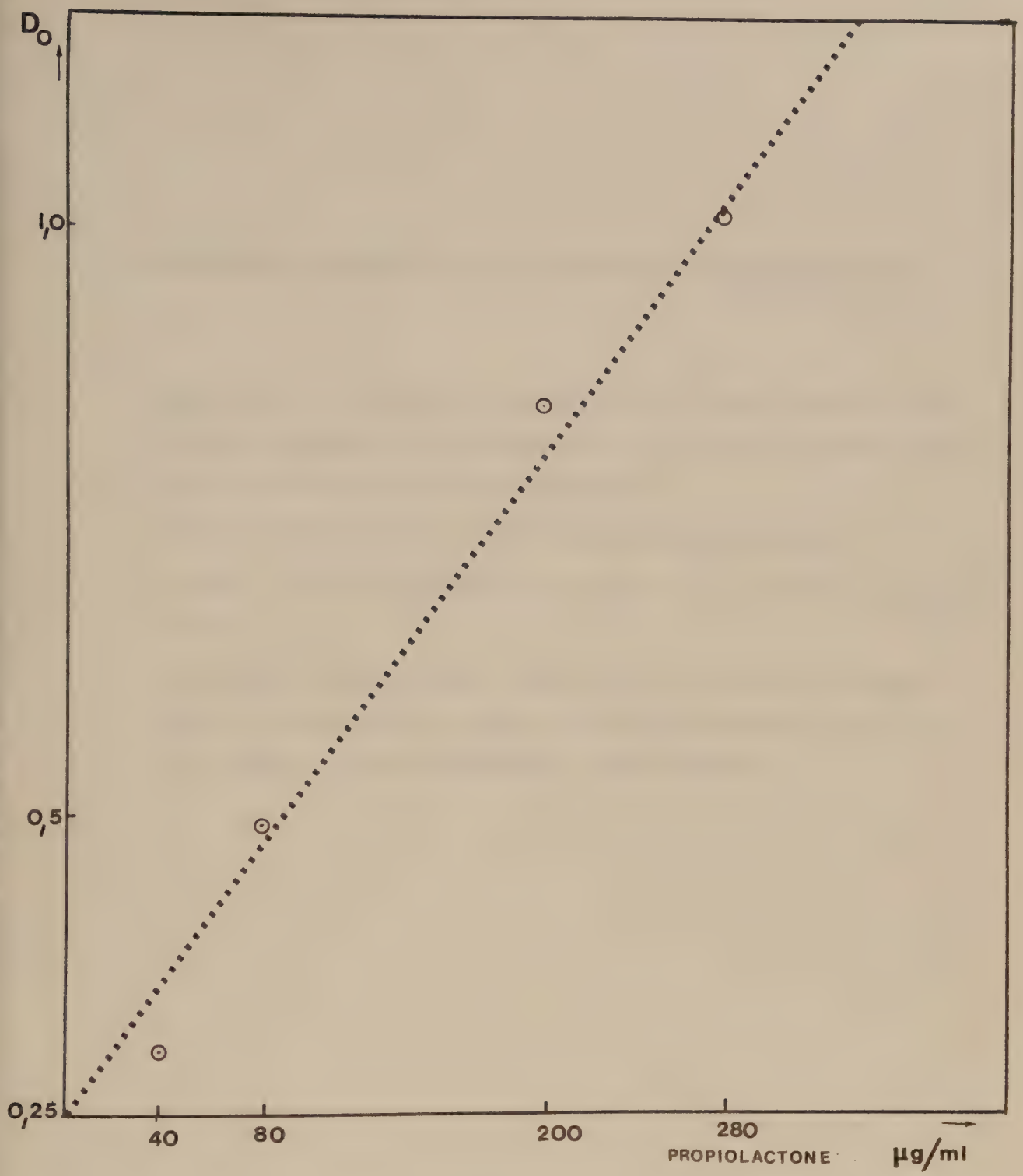
Des essais préliminaires nous ont amené à modifier la technique originale de SAWICKI dans le cas de la propiolactone.

Les essais ont été opérés à 100º et non à 180º étant donné que la propiolactone a un point d'ébullition de 162º.

L'alcalinisation a été réalisée à l'aide de diméthylformamide ou de cyclohexylamine.

Nous avons de plus, constaté que le maximum d'absorption est situé à 633 nm dans le cas de la propiolactone et que la loi de BEER-LAMBERT est vérifiée pour des concentrations en propiolactone comprises entre 40 µg et 200 µg/ml. Le produit coloré obtenu est stable pendant au moins une heure et les produits de dégradation n'interfèrent pas.

Bien que nos essais n'aient porté que sur des dilutions préparées à partir de propiolactone pure, l'emploi de ce réactif paraît intéressant étant donné la stabilité du composé obtenu.



DOSAGE DE LA PROPIOLACTONE PAR LA 4-NITRO PHENYLHYDRAZONE DE L'ALDEHYDE ISONICOTINIQUE

3. CONCLUSION GENERALE SUR LES METHODES COLORIMETRIQUES :

Nous avons pu établir et préciser les modalités de deux méthodes originales applicables à la propiolactone pure avec une sensibilité satisfaisante.

L'une mettant en jeu le 2-7-dihydroxynaphtalène.

L'autre, la p.nitrophénylhydrazone de l'aldéhyde isonicotinique.

Toutefois, ces méthodes paraissent délicates d'emploi pour la recherche de traces de propiolactone et dans ce cas précis, d'une sensibilité insuffisante.

C O N C L U S I O N

C O N C L U S I O N

L'étude de la propiolactone nous a conduit dans un premier temps à étudier ses propriétés physicochimiques et principalement ses propriétés alkylantes en vue de choisir celles qui seraient le mieux adaptées à son identification, son dosage et la détection de traces.

Nous avons ainsi été amené à retenir la réaction de formation du nitropropionate de sodium dont le comportement polarographique caractéristique autorise la recherche de traces de propiolactone ; dans les conditions opératoires mises au point, la sensibilité de la méthode permet de détecter des traces de propiolactone de l'ordre de 10 µg/ml. L'application de cette méthode à l'étude de la vitesse d'hydrolyse dans des conditions diverses, nous a permis d'observer des variations importantes selon le milieu réactionnel et la qualité de propiolactone utilisée. C'est ainsi que nous avons décelé des traces de propiolactone dans un vaccin de l'ordre de 50µg/ml, après un temps de contact de 60 minutes.

De plus, nous avons étudié diverses méthodes de dosage colorimétrique de la propiolactone.

L'étude effectuée nous a permis d'améliorer les modalités pratiques de quelques techniques (4-4' nitrobenzylpyridine). Nous avons, de plus, appliqué au dosage de la propiolactone la formation de composés colorés avec le 2,7-dihydroxynaphtalène et la 4-nitrophénylhydrazone de l'aldéhyde iso-

nicotinique. Ces réactions permettent de déceler des traces de propiolactone de l'ordre de 40 µg/ml. Elles sont adaptables au dosage ou aux recherches de traces dans des milieux simples. Toutefois, leur sensibilité et leur spécificité sont inférieures à celle de la méthode polarographique. La reproductibilité de cette méthode, en particulier, nous a conduit à la retenir pour les recherches de traces de propiolactone dans des milieux complexes, tels que les vaccins.

Nos résultats montrent également que la vitesse d'hydrolyse doit être prise en considération lors de l'utilisation de la propiolactone comme agent d'inactivation ou de stérilisation.

Nous espérons que cette étude contribuera sur le plan de la toxicologie et de la technologie à préciser les propriétés et les modalités d'emploi de la propiolactone.

BIBLIOGRAPHIE

I. ALLEN (E) - SEAMAN (W)
Anal. Chem. 27 - 4 - 540/543 (I955)

2. ANDRAU (J) - ANDRAU (D.G) - BERTHELAY (J.C)
C. Rend. Soc. Biol. I64 - 8 - 9 - I7II (I970)

3. ARMAND (J) - SOUCHAY (P)
Chim. Analyt. 44 - 6 - 239/242 (I962)

4. BARTLETT (P.B) - SMALL (G)
J. Am. Chem. Soc. 72 - 4867 (I950)

5. BARTLETT (P.D) - RYLANDER (P.N)
J. Am. Chem. Soc. 73 - 4273 (I95I)

6. BELIKOV (VM)
Chem. Abstr. 55 - 8325 (I96I)

7. BENESCH (R) - BENESCH (R.E)
Journ. Am. Chem. Soc. 73 - 339I/3396 (I95I)

8. BIERL (B.A) - BEROZA (H) - ALDRIDGE (M.H)
Anal. Chem. 43 - 6 - 636/64I (I97I)

9. BOUTWELL (R.K) - COLBURN (N.H) - MUCKERMAN (C.C)
Ann. N. Y. Acad. Sci. I63 - 2 - 75I/764 (I969)

IO. CAGE (J)
Analyst. 82 - 587/589 (I957)

II. CHIA (L.H.L.) - HUANG (H.H)-WONG (Y.F)
J. Chem. Soc. B. 6 - II38/II4I (I970)

I2. COLBURN (N.H) - BOUTWELL (R.K)
Cancer. Res. 26 - 7IOI (I966)

I3. CRITCHFIELD (F.E) - JOHNSON (J.B)
Anal. Chem. 29 - 5 - 797/880 (I957)

I4. DAVIS (R.E) - SUBA (L) - KLIMISHIN (P) - CARTER (J)
Journ. Am. Chem. Soc. 9I - I - I04 (I969)

I5. DETERMANN (H) - JOACHIM (H.U)
Z. Klin. Chem. Klin Biochem. 9 - 5 - 398/40I (I97I)

I6. DICKENS (F)
Brit. Med. Bull. 20 - 96 (I964)

I7. DICKENS (F) - JONES (H.E.M)
Brit. J. Cancer. I5 - 85 (I96I)

I8. DIXON (B.E) - HANDS (G.C)
Analyst 84 - 463/464 (I959)

I9. EPSTEIN (J) - ROSENTHAL (R.W) - ESS (R.J)
Anal. Chem. 27 - 9 - I435/I439 (I955)

20. FAYET (M.T) - PETERMANN (M.G) - FONTAINE (J) - TERRE (J) ROUMIANTZEFF (M)
Ann. Inst. Pasteur II2 - 65 (I967)

2I. FEAZEL (C.E)
Report. 3033 - 740 - III - Nov. I956

22. FRAENKEL (M.L) - CONRAT (J)
J. Biol. Chem. I54 - 227 (I944)

23. FRIEDMAN (O.M) - BOGER (E)
Anal. Chem. 33 - 7 - 096/9IO (I96I)

24. FRIEDMAN (L) - LONG (F.A)
J. Am. Chem. Soc. 75 - 2832 (I953)

25. GOLUMBAC (C) - FRUTON (J.S)- BERGMANN (M)
J. Org. Chem. II - 5I8 (I946)

26. GOWARD (G.W) - BRICKER (C.E) - WILDMAN (W.C)
J. Org. Chem. 20 - 378 (I955)

27. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 70 - 998 (I948)

28. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 70 - 999 (I948)

29. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 70 - I 00I (I948)

30. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 70 - I 003 (I948)

3I. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 70 - I 004 (I948)

32. GRESHAM (T.L)
Brevet U. S. 2,449 - 987 (I948)

33. GRESHAM (T.L)
Brevet U. S. 2,449 - 988 (I948)

34. GRESHAM (T.L)
Brevet U. S. 2,449 - 989 (I948)

35. GRESHAM (T.L) - FORREST (W)
Brevet U. S. 2,449,992 (I945)

36. GRESHAM (T.L) - FORREST (W)
Brevet U. S. 2,449,996 (I945)

37. GRESHAM (T.L) - FORREST (W)
Brevet U. S. 2,449,993 (I945)

38. GRESHAM (T.L) - FORREST (W)
Brevet U. S. 2,449 - 99I (I945)

39. GRESHAM (T.L) - FORREST (W)
Brevet U. S. 2,449 - 990 (I945)

40. GRESHAM (T.L)
Brevet U. S. 2,449 - 995 (I948)

4I. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 7I - 66I (I949)

42. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 7I - 2 807 (I949)

43. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 72 - 72 (I950)

44. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W.)
J. Am. Chem. Soc. 73 - 2 345 -I95I)

45. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - SHAVER (F.W)
J. Am. Chem. Soc. 73 - 3 I68 (I95I)

46. GRESHAM (T.L) - SHAVER (F.W)
Brevet U. S. 2,563 - 034 (I95I)

47. GRESHAM (T.L) - FORREST (W)
Brevet U. S. 2,563 - 035 (I95I)

48. GRESHAM (T.L) - SHAVER (F.W) - JANSEN (J.E)
J. Am. Chem. Soc. 74 - I 323 (I952)

49. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E)
- Brevet U. S. 2,602 - 802 (I952)

50. GRESHAM (T.L) - JANSEN (J.E) - WERBER (F.X)
J. Am. Chem. Soc. 76 - 609 (I954)

51. HARTMAN (F.W) - KELLY (A.R) - LO.GRIPPO (G.A)
Gastroenterology 28 - 244/256 (I955)

52. HOFFMAN (R.K) - WARSHOWSKY (I)
Appl. Microbiology 6 - 358/362 (I958)

53. HOLZMAN (G) Office of Scientific Research and Development
Cf. Réf. I9 EPSTEIN (J) - ROSENTHAL (R.W) - ESS (R.J)

54. HURD (C.D) - HAYAO (S)
J. Am. Chem. Soc. 74 - 5 889/5 893 (I952)

55. JOHANNSON (H)
Lund Univ. Annual
New Series. Div. 2 - I2 - 8 (I9I5)

56. JOHANNSON (H)
Chemisches Zentralblatt II - 557 (I9I6)

57. KEMULA (W) - WIESLAWA (T.R)
Chem. Abstracts 56 - 6 798 (I962)

58. KEMULA (W) - RUBASZEWSKA (W.I)
Rocznicki Chem. 37 - I597 (I963)

59. KOBAYASHI (N)
Kogyo . Kagaku . Zasshi 73 - 2 - 357/359 (I970)

60. KOENIGS (E) - KOHLER (K) - BLINDOW (K)
Berichte 58 B - 933 - (I925)

6I. KOLTHOFF (I.M)
Polarography. Vol. 2 page 270 éditeur J.Lingane N.Y. Interscience I952

62. KORNBLUM (N)
J. Am. Chem. Soc. 79 - 2 507 (I957)

63. KUNG (F.E.)
Brevet U. S. 2,352,64I (I944)

64. KUNG (F.E.)
Brevet U. S. 2,376,704 (I946)

65. KUNG (F.E)

Brevet U. S. 2,356,459 (I94I)

66. LAMOUROUX (A)

Mém. Poudres 38 - 383 (I956)

67. LARSON (H.O)

The chemistry of the nitro and nitroso groups
M.Ferrer - Interscience éditeur (I969)

68. LIEBERMAN (M.W) - BANEY (R.N) - LEE (R.E) - SELL (S)
FARBER (E)

Cancer Res. 3I - 9 - I297/I306 (I97I)

69. LO GRIPPO (G.A) - OVERHULSE (P.R) - SGILAGYI (D.E)
HARTMAN (F.W)

Lab. Investigations 4 - 2I7/23I (I955)

70. LO GRIPPO (G.A)

Ann. N. Y. Acad. Sci. 83 - 578 (I960)

7I. LO GRIPPO (G.A.) - HARTMAN (F.W)

J. Immunol 75 - I23 (I955)

72. LOSSEN (W) - KOWSKI (E)

Liebig's. Ann. Chem. 342 - I28 (I905)

73. MAIRONOVSKII (S.G) - BELIKOV (V.M) - KORCHEMNAYA (T.B)
KLIMOVA (V.A) - NOVIKOV (S.S)

Chem. Abstr. 55 - I9 832 (I96I)

74. MATHESON (H) - ISBELL (H.S) - SMITH (E.R)

J. Res. Natl. Bur. Stand 28 - 95 - (I942)

75. MATSUMOTO (H) - HYLIN (J.W) - MIYAHARA (A)

Toxicol. Appl. Pharmacol. 3 - 493/499 (I96I)

76. MAYER (F.X) - HANSCH (M) - MACHATA (G)

Mikroch. Acta. 38 - 59 (I95I)

76 bis. MEITES (L)

Polarographic Techniques - Interscience Edit. (I965)

77. MERCK INDEX page 873 édition I968

78. MISHMASH (M) - MELOAN (C.E)
Anal. Chem. 44 - 4 - 835/836 (I972)

79. MOODY (A.B)
Brevet U. S. 873-0I2 (I970) - Chem. Abstr. I3340 y-72 (I972)

80. NAGAKURA (S)
Mol. Phys. 3 - I52 (I960)

8I. NASH (T)
Biochem. Journal (London) 55 - 4I6/42I (I953)

82. NISHIO (D)
Ger. Offen. I,8II - 070 (I970) Chem. Abstr. I0072I2-72 (I970)

83. NORPOTH (H) - SCHRIEWER (H) - RAVEN (H.M)
Arzn. Forschung 2I - II - I 7I8/I 72I (I97I)

84. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE 22 - 5 - 2I8 (I968)
(Bulletin O. M. S.)

85. PALMES (E.D) - ORRIS (L) - NELSON (N)
Amer. Ind. Hyg. Ass. J. 23 - 257 (I962)

86. PETRU (F)
Coll. Czech. Chem. Comm. I2 - 620 - (I947)

87. PHILLIPS (C.R)
Am. Journ. Hyg. 50 - 280 (I949)

88. PRICE (C.C)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 68 - 3 - 663 (I958)

89. RAO (C.N) - MASKAR (B)
The chemistry of the nitro and nitroso group.
H. Ferrer - Interscience éditeur (I969)

90. ROBERTS (J.J) - WARWICK (G.P)
Biochem. Pharmacol. I2 - I 44I (I963)

9I. ROBERTS (J.J) - WARWICK (G.P)
Biochem. Journ. 87 - I4 (I963)

92. ROE (F.J.C) - GLENDENNING (O.M)
Brit. J. Cancer. IO - 357 (I956)

93. ROMA (M.E)
Brevet U. S. 2,602-80I (I952)

94. ROSS (W.C.J)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 68 - 3 - 669 (I958)

95. ROSS (W. C. J.)
Biological alkylating agents
Butterworths -edit. (I962)

96. SAWICKY (E) - BENDER (D.F) - MAUSER (T.R) - WILSON (R.M) MEEKER (J.E)
Anal. Chem. 35 - IO - I479 (I963)

97. SCHONWALDER (C.O)
Vapor phase bactericides
Thèse Ph. D Pennsylvannie University (I968)

98. SCHROLL (G) - KLEMMENSEN (P) - LAWESSON (S.O)
Acta Chem. Scand I8 - 2 20I (I964)

99. SEARLE (C.E)
Brit. J. Cancer I5 - 804 (I96I)

IOO. SEVER (J.L) - CASTELLANO (G.A) - PELON (W) - HUEBNER (R.J) WOLMAN (F)
J. Lab. Clin. Med. 64 - 983 (I964)

IOI. SOUCHAY (P)
Compt. Rend. Acad.Sci. 255 - 688 (I962)

I02. SNELL (F.D) - SNELL (C.T)
Colorimetric methods of analysis éditeur : VAN NOSTRAND
Vol. III A page I52 (I96I)

I03. SPINER (D.R) - HOFFMAN (R.K)
Appl. Microbiol. 8 - I52 (I960)
I04. STENBACH (F)
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Pathol. Sect. A
78 - 2 - I92/204 (I970)
I05. STEPHAN (W)
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7 - 5 - 5I8/520 (I969)
I06. STEPHAN (W)
Zentralbl. Bakt. Parasit. Infek. Hyg. Abt. I Orig.
2I5 - 3 - 38I/385 (I970)
I07. STEWART (D.E) - BONNER (W.A)
Anal. Chem. 22 - 793 (I950)
I08. SWAIN (C.G) - SCOTT (C.B)
J. Anal. Chem. Soc. 75 - I4I (I953)
I09. SZILAGYI (D.E) - OVERHULSE (P.R) - SHOHMARD (C.D)
Surgical.Forum 244/252 (Nov. I954)
II0. TAUBMAN (M.A) - ATASSI (M.Z)
Biochem. Journ. I06 - 829 (I968)
III. THIBERT (R.J) - BOYLE (A.J)
Talanta 7 - I75 (I96I)
II2. THIBERT (R.J) - JONSTON (J.R)
Can. Journ. Chem. 47 - 265 (I969)
II3. THIBERT (R.J) - BLASS (K.G)
Mikrochim. Acta 3 - 390/393 (I972)
II4. TRUHAUT (R)
Conférence prononcée aux XXIIe Journées Pharmaceutiques Françaises (I972) - pages 29/73 éditeur : SEPES
II4 bis. TRUHAUT (R) - DELACOUX (E) - BRULE (G) BOHUON (C)
Clinica. Chimica Acta 8 - 235/245 (I963)
II5. TYLER (W.P) - BEESING (D.W)
Anal. Chem. 24 - 9 - I 5II/I 5I3 (I952)

II6. WALPOLE (A.L) - ROBERTS (D.C) - ROSE (F.L) - HENDRY (J.A) HOLMER (R.F)

Brit. J. Pharmacol. 9 - 306 (I954)

II7. ZAUGG (H.E)

Org. React. 8 - 305 (I954)

TABLE DES MATIERES

page

PREMIERE PARTIE : RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS :

Chapitre I : propriétés physicochimiques de la propiolactone---------- 5

Chapitre II : action biologique de la propiolactone---------- 17

DEUXIEME PARTIE : ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DE LA PROPIOLACTONE :

Chapitre III : étude analytique de la propiolactone

I. Vérification des critères de pureté----------21

I. I. Spectroscopie infra-rouge-------21

I. 2. Indice de réfraction----------23

I. 3. Dosage des impuretés acides------23

I. 4. Dosage de la propiolactone.------27

Chapitre IV : polarographie de la propiolactone

A. Polarographie directe----------30

B. Polarographie du dérivé nitré

- Partie expérimentale -

I. préparation et isolement de l'acide nitropropionique et de son sel de sodium ----------36

page

II. polarographie du nitropropionate de sodium

I. généralités ----------40

2. partie expérimentale

a. influence du pH ----------43

b. influence de la concentration ----------48

c. influence des conditions de mesure ----------51

d. influence de la force ionique sur le courant de réduction ----------52

e. conclusion ----------53

C. Mise au point d'une technique d'identification et de dosage de la propiolactone

I. Méthode proposée

a. matériel et méthodes ----------54

b. réactifs ----------55

c. mesure ----------55

2. Justification de la méthode

a. influence du pH ----------56

b. influence de la concentration en nitrite de sodium ----------59

c. influence de la température et de la durée du chauffage ----------62

d. influence des produits de dégradation ----------67

page

e. étude des variations de l'intensité du courant de réduction en fonction de la concentration en propiolactone ---------- 67
f. vérification de la spécificité de la méthode ---------- 69
g. conclusion ---------- 70

Chapitre V : Applications

I. étude de la cinétique de dégradation de la propiolactone en solution aqueuse
- résultats obtenus ---------- 72
2. étude d'un vaccin antirabique ---------- 84

TROISIEME PARTIE : COLORIMETRIE DE LA PROPIOLACTONE :

Chapitre VI : Réactions diverses

I. réaction au 2,7 dihydroxynaphtalène ---------- 88
2. réaction avec l'hydroxylamine ---------- 90
3. réaction avec la pyridine ---------- 91
4. réaction à l'acide chromotropique ---------- 91
5. réaction de Hantzsch ---------- 91

Chapitre VII : Réactions d'alkylation

I. réaction à la 4-4'-nitrobenzylpyridine
- dosage des alkylants ---------- 93
- partie expérimentale ---------- 97

page

- étude des conditions opératoires
  - pH ---------- 98
  - température ---------- 98
  - concentration en réactif ---------- 100
  - vérification de la loi de Beer-Lambert ---- 100

2. réaction à la 4-nitrophénylhydrazone de l'aldéhyde isonicotinique
   - partie expérimentale
     a. synthèse du réactif ---------- 103
     b. contrôle du réactif ---------- 104
     c. mode opératoire ---------- 104
   - résultats obtenus ---------- 105

3. Conclusion générale sur les méthodes colorimétriques ---------- 107

CONCLUSION GENERALE ---------- 109

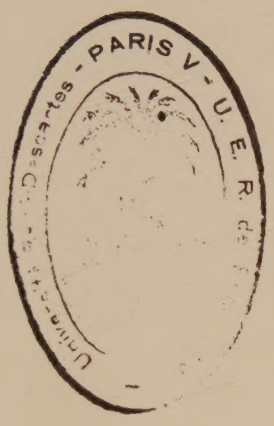
BIBLIOGRAPHIE ---------- 111

Paris le 24 Mai 1973

Vu et permis d'imprimer

le Vice-Président de l'Université

Paris V



G. DILLEMANN